

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

Colaboración funcional entre p21 y pRb en el mantenimiento de la homeostasis y la supresión tumoral en epitelios estratificados

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

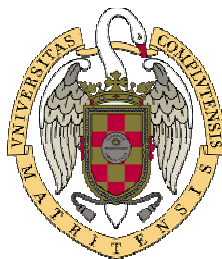
PRESENTADA POR

Cristina Saiz Ladera

Directores

Carmen Segrelles Huelga
Jesús María Paramio González

Madrid, 2014



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I

TESIS DOCTORAL

Colaboración funcional entre p21 y pRb en el mantenimiento de la homeostasis y la supresión tumoral en epitelios estratificados

Cristina Saiz Ladera

Directores de la tesis:
Carmen Segrelles Huelga y Jesús María Paramio González

Unidad de Oncología Molecular, CIEMAT
Madrid, Junio 2014



El trabajo experimental presentado en esta memoria de Tesis Doctoral ha sido realizado en la Unidad de Oncología Molecular del Centro de Investigaciones Energéticas Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) bajo la dirección del Dr. Jesús M^a Paramio González y la Dra. Carmen Segrelles Huelga.

Vº Bº directores de tesis

Jesús M^a Paramio González

Carmen Segrelles Huelga

Abreviaturas

%	Porcentaje
°C	Grados Celsius
µg, µL, µM	Microgramo, microlitro, micromolar
F/F	Secuencias intrónicas <i>loxP</i> flanqueando un exón
ΔEpi	<u>D</u> elección condicional en epidermis.
ADN	<u>Á</u> cido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico.
ADNc	<u>Á</u> cido <u>D</u> esoxirribo <u>N</u> ucleico complementario.
Akt	Serina-treonina quinasa, del retrovirus Akt 8.
ANOVA	Del inglés, <i><u>A</u>nalysis <u>O</u>f <u>V</u>ariance</i> . Análisis de varianza.
ARN	<u>Á</u> cido <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleico.
ARNm	<u>Á</u> cido <u>R</u> ibo <u>N</u> ucleico mensajero.
BrdU	<u>B</u> romo- <u>d</u> eoxi <u>U</u> ridina.
BSA	Del inglés, <i><u>B</u>ovine <u>S</u>erum <u>A</u>lbumine</i> . Seroalbúmina bovina.
CDK	Del inglés, <i><u>C</u>ycling-<u>D</u>ependent <u>K</u>inases</i> . Quinasas dependientes de ciclinas.
CCE	<u>C</u> arcinoma de <u>C</u> élulas <u>E</u> scamosas
CECyC	<u>C</u> arcinoma <u>E</u> scamoso de <u>C</u> abeza y <u>C</u> uello.
CEEA	<u>C</u> omité de <u>É</u> tica de <u>E</u> xperimentación <u>A</u> nimal.
ChEA	Del inglés, <i><u>C</u>hip <u>E</u>nrichment <u>A</u>nalysis</i>
Chk	Del inglés, <i><u>C</u>heckpoint <u>K</u>inase</i> . Quinasa del punto de control mitótico.
CKI	Del inglés, <i><u>C</u>ycling-<u>D</u>ependent <u>K</u>inases <u>I</u>nhibitors</i> . Inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.
Cyc	Del inglés, <i><u>C</u>ycling</i> . <u>C</u> iclina.
Ct	Del inglés, <i><u>C</u>ycle <u>t</u>hreshold</i> .
DAB	<u>D</u> i <u>A</u> mino <u>B</u> encidina.
DAPI	Del inglés, <i>4, 6 <u>D</u>i<u>A</u>midin-2-<u>P</u>henyl-<u>I</u>ndole</i> , 4,6 diamidino-2-fenil-indol.
DAVID	Del inglés, <i><u>D</u>atabase for <u>A</u>notation, <u>V</u>isualization and <u>I</u>ntegrated <u>D</u>iscovery</i> . Base de datos de anotación, visualización y descubrimientos integrados.
DMBA	7, 12-DiMetilBenz(a) Antraceno.
Dpc	<u>D</u> ías <u>p</u> ost <u>c</u> oitum
dNTP	Del inglés, <i><u>d</u>eoxi<u>N</u>ucleotidil <u>T</u>ri<u>P</u>hosphate</i> . Deoxinucleotidil trifosfato.
EDTA	<u>E</u> tilén-Diamino- <u>T</u> etra- <u>A</u> cetato.
EGFR	Del inglés, <i><u>E</u>pidermal <u>G</u>rowth <u>F</u>actor <u>R</u>eceptor</i> . Receptor del factor de crecimiento epidérmico.
EGTA	<u>E</u> tilén- <u>G</u> licol- <u>T</u> etra- <u>A</u> cetato.

Abreviaturas

ERK	Del inglés, <i>Extracellular signal- Regulated Kinase</i> . Quinasa regulada por señal extracelular.
FACS	Del inglés, <i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FELASA	Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio
FITC	Del inglés, <i>Fluorescein IsoThiCyanate</i> . Isotiocianato de fluoresceína.
GEPAS	Del inglés, <i>Gene Expression Profile Analysis Suite</i> . Herramienta de análisis del perfil de expresión génica.
GOBP	Del inglés, <i>Gene Ontology Biological Processes</i> . Ontología de los procesos biológicos.
GSEA	Del inglés, <i>Gene Set Enrichment Analysis</i> . Análisis de enriquecimiento del set de genes.
Hepes	Del inglés, <i>N2-HydroxyEthylPiperazine-N'-2-EthaneSulphonic acid</i> . Ácido N2-hidroxietilpiperacín N'-2-etanosulfónico.
NOD-SCID	<i>Nonobese-Diabetic/Severe Combined Immunodeficiency</i>
H&E	<i>Hematoxilina/Eosina</i> .
IKK	Del inglés, <i>IκB Kinase</i> . Quinasa IκB.
IL	Del inglés, <i>Interleukin</i> . Interleuquina.
INK4	Del inglés, <i>Inhibitors of Cyclin dependent Kinases 4</i> . Locus que codifica inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas.
IP	Ioduro de propidio
ItgA6-FITC	Integrina α6-FITC
K	Del inglés, <i>Keratin</i> . Queratina.
K-ras	Del inglés, <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i> .
LRC	Del inglés, <i>Label Retaining Cell</i> . Célula que retiene el marcaje.
MAPK/ERK	Del inglés, <i>Mitogen-Activated Protein Kinases/</i>
MDSC	Del inglés <i>Myeloid-Derived Suppressor Cell populations</i> , poblaciones celulares supresoras de derivación mieloide.
MEK	Del inglés, Mitogen-activated protein kinase. Proteína quinasa activada por mitógenos.
NFκB	Del inglés, <i>Nuclear Factor κB</i> . Factor nuclear κB.
NK	Del inglés, <i>Natural Killer</i> . “Células asesinas”
PAGE	Del inglés, <i>PolyAcrilamide Gel Electrophoresis</i> . Electroforesis en gel de poliacrilamida.
PBS	Del inglés, <i>Phosphate Buffered Saline</i> . Tampón fosfato salino.
PCNA	Del inglés, <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> . Antígeno nuclear asociado a células proliferativas.
PCR	Del inglés, <i>Polymerase Chain Reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
PTEN	Del inglés, <i>Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten</i> . Fosfatasa homóloga de la tensina delecionada del cromosoma 10.
PI3K	Del inglés, <i>Phospho Inositol 3 Kinase</i> . Fosfoinositol 3 quinasa.
pRb	Proteína del retinoblastoma

Abreviaturas

RCS	Rotura de <u>C</u> adena <u>S</u> imple
RDC	Rotura de <u>D</u> oble <u>C</u> adena
rpm	Revoluciones por minuto
SAM	Del inglés, <i><u>S</u>ignificance <u>A</u>nalysis of <u>M</u>icroarrays.</i>
SDS	Del inglés, <i><u>S</u>odium <u>D</u>odecyl-<u>S</u>ulphate</i> . Dodecil sulfato sódico.
Shh	Del inglés, <i><u>S</u>onic <u>h</u>ed<u>h</u>ehog</i>
Stat3	Del inglés, <i><u>S</u>ignal <u>t</u>ransducer and <u>a</u>ctivator of <u>t</u>ranscription <u>3</u>.</i>
SV40	Del inglés, <i><u>S</u>imian <u>v</u>acuolating virus <u>40</u>.</i>
TBE	Del inglés, <i><u>T</u>ris-<u>B</u>orate-<u>E</u>DTA</i> , Tris-borato-EDTA.
TBS	Del inglés, <i><u>T</u>ris <u>B</u>uffered <u>S</u>aline</i> , Tampón Tris salino.
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TGF	Del inglés, <i><u>T</u>umor <u>G</u>rowth <u>F</u>actor</i> . Factor de crecimiento tumoral.
TNF	Del inglés, <i><u>T</u>umoral <u>N</u>ecrosis <u>F</u>actor</i> , Factor de necrosis tumoral.
Tp53	Del inglés, <i><u>T</u>umor <u>p</u>rotein <u>53</u></i> . Nombre del gen en humano.
TPA	Del inglés, <i><u>12-O-T</u>etradecanoil-<u>P</u>horbol-<u>13-A</u>cetate</i> , 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.
Tris	<u>T</u> ris-(hidroximetil)-aminometano
Trp53	Del inglés, <i><u>T</u>ransformation related <u>p</u>rotein <u>53</u></i> . Nombre del gen en ratón.
T-test	Prueba <i>t</i> de <i>Student</i>
Tween	Tween 20
UCM	Universidad Complutense de Madrid.
V	Voltios.
VPH	Virus de papiloma humano.
Wnt	Del inglés, <i><u>W</u>ingless/<u>I</u>nt</i> , Vía de Wingless/Int

ABSTRACT**INTRODUCTION**

The Retinoblastoma tumor suppressor (pRB), the *Rb1* gene product, is the leading member of the pocket protein family (pRb, p107 and p130), which plays unique and overlapping roles in differentiation and cell cycle control (Ewen, Xing et al. 1991, Hannon, Demetrick et al. 1993, Classon and Harlow 2002). Of them, the *Rb* gene is the predominant family member mutated in human tumors. pRb is a nuclear phosphoprotein that actively represses genes required for the G1-S phase transition (Weinberg 1995, Sherr and McCormick 2002, Burkhardt and Sage 2008), in part through the formation of complexes with specific E2F transcription factor family members (Dyson 1998, Chen, Tsai et al. 2009). During normal cell cycle progression, pRb is functionally inactivated through phosphorylation by cyclin/cdk complexes (Lee, Shew et al. 1987, Mayol, Grana et al. 1993, Sherr and Roberts 1999, Malumbres and Barbacid 2001, Malumbres and Barbacid 2009). This releases E2Fs, allowing the G1 to S phase transition. The functional pRb inactivation is further regulated by two families of cdk inhibitors or cki that regulate the cdk kinase activity (Harper and Elledge 1996).

The protein p21, the *Cdkn1a* gene product, belongs to the cki family and is a critical mediator of p53-induced cell-cycle arrest (Abbas and Dutta 2009). It also modulates differentiation and apoptosis in specific cell types such as keratinocytes through the direct association and control of several transcription factors and/or transcription coactivators (Di Cunto, Topley et al. 1998, Gartel and Tyner 1999, Dotto 2000, Li, Yea et al. 2005, Devgan, Bach-Cuc et al. 2006, Rowland and Peeper 2006, Abbas and Dutta 2009, Marques-Torrejon, Porlan et al. 2013). Evidence of the tumor suppressor activity of p21 comes from the analysis of p21-deficient mice, which develop spontaneous tumors at late age (Martin-Caballero, Flores et al. 2001), and the phenotypic aggravation due to p21 loss of a variety of genetically engineered mice bearing oncogenic alterations (Franklin, Godfrey et al. 2000, Paramio, Segrelles et al. 2001, Yang, Mathew et al. 2001, Carnero and Beach 2004, Martin-Caballero, Flores et al. 2004, Garcia-Fernandez, Garcia-Palencia et al. 2011). Although the aged p21-deficient mice display epithelial tumors with very low incidence, they also show increased susceptibility to chemical carcinogenic treatments in these tissues (Philipp, Vo et al. 1999, Topley, Okuyama et al. 1999, Jackson, Adnane et al. 2002, Poole, Heap et al. 2004).

The epidermis is a unique model to study proliferation and differentiation. In this tissue, the pRb-deficiency (pRb^{ΔEpi} mice) promotes increased proliferation and altered

differentiation leading to moderate epidermal hyperplasia and hyperkeratosis (Ruiz, Santos et al. 2004). However, no spontaneous tumors were observed (Ruiz, Santos et al. 2004). Moreover, chemical carcinogenesis experiments in pRb^{ΔEpi} mice showed reduced skin tumor development accompanied with increased rate of the malignant conversion (Ruiz, Santos et al. 2005). These effects were attributed to early p53 induction. This creates a selective pressure in the benign tumors leading to premature p53 loss and thus malignant conversion (Ruiz, Santos et al. 2005, Ruiz, Santos et al. 2006). In agreement, we had previously found that pRb and p53 cooperate to suppress mouse epidermal tumors. Remarkably, spontaneous tumors arising in pRb^{ΔEpi};p53^{ΔEpi} mice were highly aggressive, display early signs of chromosomal instability and high metastatic behavior (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008, Martinez-Cruz, Santos et al. 2009, Bornachea, Santos et al. 2012).

Following, these observations we have generated mice in which p21 deficiency is combined with specific pRb loss in stratified epithelia (*Rb*^{F19/F19};K14cre;*Cdkn1a*^{-/-}, hereafter pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}-mice). In contrast with parental mice, pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}-mice develop an aggravated phenotype characterized by skin inflammatory processes, spontaneous tumor development, and a partial depletion of epidermal adult stem cells. Remarkably, the histology and transcriptome analyses of the spontaneous tumors indicate striking similarities with human oral squamous cell carcinomas.

OBJECTIVES

The global aim of the present work is to determine the possible existence of overlapping cooperative roles between pRb and p21 in stratified epithelia. In particular we will focus our analyses on proliferation, differentiation and tumor development. These aspects are particularly reflected in the following objectives:

1.- Analysis of the functional consequences of pRb and p21 deficiency in stratified epithelia through the generation of a mouse model in which the pRb ablation is restricted to stratified epithelia in combination with complete p21 loss. In these mice we will study:

1.1 The epidermal phenotype affecting proliferation and differentiation

1.2 The possible alterations in epidermal homeostasis due to effects on stem cell population.

2.- To determine the possible role of p21 as a tumor suppressor in the absence of through:

2.1 Analysis of spontaneous tumor development in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice

2.2 Studies on the molecular basis of this spontaneous tumor development

3.- Given the high frequency of oral tumors observed in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice, we aim to perform a comparative genomic characterization with human oral cancers in order to validate these mice as a possible model of the human pathology.

RESULTS AND CONCLUSIONS

The p21 loss aggravates the epidermal phenotype of pRb^{ΔEpi} mice

The p21 loss does not cause any evident epidermal phenotype, whereas pRb^{ΔEpi} mice display mild hyperkeratosis and skin hyperplasia (Ruiz, Santos et al. 2004). In contrast, pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice displayed a severe phenotype with hair loss and frail appearance and also showed severe skin hiperplasia with massive hyperkeratosis and signs of parakeratotic differentiation. These observations were reinforced by the altered expression of differentiation markers, such as keratins K5, K10 and K6, and the vast increase in proliferation. In this regard, we observed that cells committed to the differentiation program (K10+) were still able to proliferate (BrdU+), indicating a possible uncoupling between differentiation and proliferation programs. To further substantiate these observations, primary keratinocytes of the different genotypes were induced to differentiate *in vitro* by increasing Ca²⁺ concentration. After 72h under these conditions control keratinocytes displayed a complete cell cycle arrest and were unable to regain proliferation upon re-stimulation with low Ca²⁺ containing medium. However, the pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} keratinocytes did not to arrest proliferation *in vitro* by this treatment. Using primary keratinocytes, we also observed increased expression and activity of various E2F members, which may partially account for the observed alterations.

The pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice were also characterized by hair loss and development of spontaneous wounds that do not heal normally. This may suggest possible alterations in epidermal stem cell pools in these mice. In agreement, we noted a reduction in K15+ and CD34+ cells in the epidermis of these mice. Moreover, in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} epidermis displayed altered Wnt, Hedgehog and Notch signaling pathways, which are essential to proper epidermal stem cell functionality.

Collectively, these data demonstrate the existence of functional cooperation between p21 and pRb in the control of epidermal differentiation, proliferation and stem cell homeostasis.

The absence of p21 and pRb leads to inflammation and DNA damage in epidermis

Besides the differentiation and proliferation alterations mentioned, we detected the development of large skin inflammatory infiltrates in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice, absent in other genotypes. The characterization of such infiltrates showed the presence of lymphocytes, macrophages, mast and $\gamma\delta$ T cells, and the release of a variety of chemokines and cytokines with proinflammatory and chemoattractant properties (GCSF, GMCSF, IL16, CXCL1, CCL3, CXCL2 and TREM1), and with protumoral activities. In addition There was reduced expression of anti-inflammatory, angiostatic chemokines (CXCL9 and CCL1), which are also involved in the innate immune response. Notably, in newborn mice skin and in newborn skin grafted onto immunodeficient mice, altered expression of some of these chemo/cytokines in parallel with activation of the NF κ B and Stat3 signaling pathways was detected. Since these effects were evident prior the overt development of the inflammatory phenotype, this observation suggests that the absence of p21 and pRb in the skin keratinocytes is responsible for such inflammatory-related alterations.

Aberrant uncontrolled proliferation is often associated with DNA damage as a result of unscheduled DNA replication. We thus monitored whether the increased proliferation in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice could account for a similar response. We observed H2AX γ and p53 induction in the epidermis of these mice (but not in the control, p21^{-/-} or pRb^{ΔEpi} mice) and the activation of the ATR/CHK1 axis. Nonetheless, no signs of apoptosis were detected, but a large number of aberrant and catastrophe mitotic events, thus suggesting a proliferative-stress response due to the simultaneous absence of p21 and pRb in these cells. In agreement, whole transcriptome analyses showed DNA damage response. These genomic studies revealed striking similarities between pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} skin with pRb^{ΔEpi}, p53^{ΔEpi} and p53^{ΔEpi} pretumoral skin samples, suggesting a major role of p21 mediating the p53-mediated activities in skin.

The absence of p21 and pRb leads to spontaneous tumor development

The pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice developed spontaneous tumors in various stratified epithelia, whereas no tumors were detected in these tissues in the control, p21^{-/-} or pRb^{ΔEpi} mice. Moreover, newborn skin transplants evolve to the formation of squamous cell carcinoma. The tumors in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice appeared even at an early stages of life (few weeks) and affected primarily the oral cavity and mainly the tongue. These squamous tumors displayed high proliferation, a well differentiated histology, presence of inflammatory $\gamma\delta$ T cells and the activation of PI3K/Akt, Stat3 and MAPK signaling pathways.

These results demonstrate that p21 and pRb cooperate to suppress epithelial tumorigenesis in vivo.

The absence of p21 and pRb in stratified epithelia may represent a bona fide model of human Head and Neck SCC (HNSCC)

All the characteristics displayed by the spontaneous tumors observed in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice are often observed in human head and neck squamous cell carcinomas. This may indicate that these mice could represent a faithful model of this human pathology. To analyze this possibility a comparative metagenomic study was carried out. The assessment of deregulated genes in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mouse skin displayed very significant similarities with those previously characterized in human HNSCC clinical samples (Rhodes, Yu et al. 2004, Rhodes, Kalyana-Sundaram et al. 2007). Moreover, we have been able to establish a common mouse-human gene signature. Remarkably, this gene signature stratifies groups of human HNSCC patients with a different significant clinical outcome (metastasis-free), suggesting that these mice could represent a bona fide model of human HNSCC with a better prognosis. These studies also revealed the possible sensitivity to potential preclinical compounds with antitumoral activity. These findings, together with the histopathology observations support that the pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice could represent an accurate tool for the study of this human pathology and for the realistic development of potential new therapies.

INTRODUCCIÓN.....	1
1.- La piel.....	1
1.1. Estructura y características.....	1
1.2. Las células madre epidérmicas.....	3
1.3. Cancer y desarrollo tumoral.....	5
1.4. Tipos de tumores epidérmicos.....	7
1.5. La epidermis de ratón como sistema modelo.....	9
2.- Control del ciclo celular.....	9
2.1. La familia Retinoblastoma.....	9
2.2. p21, modulador del ciclo celular.....	13
2.3. Funciones de p21.....	14
2.4. Implicación de p21 en el desarrollo tumoral.....	16
2.5. Relación de p21 y la familia Retinoblastoma.....	18
3.- Inflamación y respuesta inmune.....	18
3.1. El componente inflamatorio de la piel.....	19
3.2. Respuesta inmune, inflamación y desarrollo tumoral.....	21
3.3. Inmunosupresión tumoral.....	23
4.- Estrés replicativo y daño en el ADN.....	24
4.1 Mecanismos de reparación de daño en el ADN.....	25
4.2. Mecanismos de eliminación de las células dañadas.....	29
5.- Carcinomas Escamosos de Cabeza y Cuello.....	31
5.1 Características.....	31
5.2 Alteraciones moleculares y modelos animales de CECyC.....	31
5.3. Implicación de pRb y p21.....	34
OBJETIVOS.....	37
MATERIALES Y MÉTODOS.....	41
1.- Modelos animales de experimentación.....	43
2.- Genotipado de los animales.....	44
3.- Monitorización tumoral.....	46
4.-Toma de muestras y procedimientos histológicos.....	46
5.-Trasplantes de piel.....	46
6.- Análisis inmunohistoquímico.....	47
7.- Detección de células mastocitarias.....	48
8.- Análisis de los niveles de proteína. <i>Western blot</i>	49

9.- Análisis multiproteico de los niveles de citoquinas y quimioquinas.....	51
10.- Cultivo de queratinocitos primarios.	51
11.- Medida de la tasa de proliferación celular.	52
12.- Diferenciación de queratinocitos primarios in vitro.	52
13.- Transfección de queratinocitos primarios.	53
14.- Ensayos de actividad Luciferasa.....	53
15.- Detección de poblaciones celulares por citometría de flujo.	54
15.1. Análisis de la población de células madre epidérmica.....	54
15.2. Análisis de las poblaciones celulares inmunes de carácter inmunosupresor.	54
15.3. Análisis del perfil de ciclo celular.	55
16.- Extracción de ARN total de pieles de ratón.	55
17.- Análisis de la expresión génica.....	56
17.1. Análisis de biochips de expresión génica. Affimetrix.	56
17.2. Identificación de factores de transcripción mediante enriquecimiento genético por inmunoprecipitación de cromatina (ChEA).....	57
17.3. Análisis de enriquecimiento génico de los genes desregulados en los ratones Rb ^{ΔEpi} ;p21-/- por GSEA.....	57
17.4. Análisis comparativo de la desregulación génica de ratón y cáncer humano. <i>Oncomine</i>	57
17.5. Análisis estadístico.	58
18.- PCR a tiempo real (qRT-PCR).....	58
RESULTADOS	61
1.- La eliminación de p21 agrava el fenotipo epidérmico de los ratones deficientes en pRb en la capa basal de la epidermis	63
1.1. Caracterización fenotípica de los animales pRb ^{ΔEpi} ;p21-/-.....	63
1.2. La epidermis del ratón pRb ^{ΔEpi} ;p21-/- muestra un aumento proliferativo.	66
1.3. Los ratones pRb ^{ΔEpi} ;p21-/- presentan alteraciones en la diferenciación epidérmica.	70
1.4. La eliminación de pRb en la epidermis de ratones deficientes en p21 desencadena un proceso inflamatorio en la piel.	71
1.5. La población de células madre epidérmicas se encuentra disminuida en la piel de los ratones pRb ^{ΔEpi} ;p21-/-	78
2.- La eliminación de Retinoblastoma en la epidermis de ratones deficientes en p21, conduce al desarrollo de tumores espontáneos.....	81
2.1. Desarrollo de tumores espontáneos en los ratones pRb ^{ΔEpi} ;p21-/-.....	81
2.2. Desarrollo de tumores espontáneos en trasplantes de piel de ratones pRb ^{ΔEpi} ;p21-/- recién nacidos.	83

2.3. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo tumoral de los ratones pRb ^{ΔEpi} ;p21-/-.....	84
2.4. Evidencia de estrés replicativo e inducción de p53 en la epidermis de los ratones pRb ^{ΔEpi} ;p21-/-.....	90
2.5. Los ratones pRb ^{ΔEpi} ;p21-/- no muestran signos de apoptosis.	92
3.- Los ratones Rb ^{ΔEpi} ;p21-/- representan un modelo para el estudio de los tumores orales.	95
3.2. Los genes desregulados en las pieles de ratón Rb ^{ΔEpi} ;p21-/- muestran similitudes con el transcriptoma de CECyC humano.....	95
3.3. Evidencias de los animales Rb ^{ΔEpi} ;p21-/- como modelo de CECyC de buen pronóstico.	97
3.4. Presencia de poblaciones celulares inmunosupresoras en los animales Rb ^{ΔEpi} ;p21-/-.	101
3.5. Desarrollo y caracterización de los tumores de lengua.	103
3.6. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de los tumores de lengua.....	105
DISCUSIÓN.....	109
p21 controla la proliferación y la diferenciación en ausencia de pRb.	111
p21 modula la respuesta a daño por estrés replicativo y la inflamación, en ausencia de pRb.	115
p21 se comporta como un supresor tumoral en ausencia de pRb en epidermis.	119
La deficiencia de pRb y p21 como modelo de desarrollo de tumores orales de buen pronóstico.	125
CONCLUSIONES	129
REFERENCIAS.....	133
ANEXOS	163

INTRODUCCIÓN.

1.- La piel.

1.1. Estructura y características.

La piel es un órgano altamente especializado que ejerce un papel vital como barrera protectora del organismo cumpliendo además funciones termorreguladoras, metabólicas e inmunológicas. Para realizar sus funciones, la piel está sometida a un programa de diferenciación, proporcionando una cobertura impermeable en constante renovación.

Histológicamente, la piel está formada por dos tejidos principales, la dermis y la epidermis. La dermis es la capa más interna y está compuesta por una red de tejido conectivo formada por una matriz de fibras, principalmente colágeno y elastina, que proporcionan flexibilidad y dan soporte a la epidermis. El componente celular mayoritario son los fibroblastos. Además, contiene terminaciones nerviosas, vasos sanguíneos y linfáticos, sirviendo de base a los folículos pilosos y a las glándulas sudoríparas derivadas de la epidermis. La epidermis, es la capa más externa siendo la primera línea de defensa contra los riesgos ambientales. Es un epitelio estratificado y queratinizado en el que se distinguen diferentes poblaciones celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. El componente celular mayoritario de la epidermis (95%) es el queratinocito. Los queratinocitos se disponen en cuatro estratos bien delimitados: germinativo o basal, espinoso, granuloso y córneo (Fig. 1). El estrato basal está formado por una capa de queratinocitos que descansan sobre la lámina basal y la dermis subyacente (Lavker and Sun 1983, Potten and Morris 1988). Es el único que contiene células con capacidad proliferativa. Durante el proceso de diferenciación epidérmica, los queratinocitos basales detienen su proliferación, sufren una serie de cambios bioquímicos y morfológicos, y migran desde la capa basal hacia las capas más externas, dando lugar al resto de capas epidérmicas. Por encima del estrato basal se encuentra el estrato espinoso donde el queratinocito posee una gran capacidad metabólica, aumenta de tamaño y establece fuertes conexiones intercelulares, denominadas desmosomas, cuya apariencia microscópica da nombre al estrato (Franke, Cowin et al. 1987). En esta capa se encuentran las células de Langerhans de carácter inmune. En el estrato granuloso los queratinocitos presentan numerosos gránulos de queratohialina que les confiere su aspecto característico, y gránulos lamelares (cuerpos de Odly) cuya exocitosis libera material lipídico alrededor de la célula, contribuyendo a la función aislante de la epidermis (Grubauer, Feingold et al. 1989). Por último, en el estrato corneo las células terminan la diferenciación, se aplanan, pierden el núcleo y quedan suspendidas sobre una matriz lipídica creando la verdadera barrera impermeable (Potts and Francoeur 1991, Plewig, Jansen et al. 1997). Estas células muertas se

desprenden por descamación. La renovación de las capas de la epidermis necesita un balance regulado entre los procesos de diferenciación y proliferación que afectan al queratinocito. En humanos se estima que la renovación de las células de la piel se produce cada 20 días, mientras que en el ratón se ha estimado entre 8 y 10 días (Potten, Saffhill et al. 1987). La formación de los diferentes estratos epidérmicos es el resultado de un programa finamente controlado que ocasiona la síntesis secuencial de diferentes proteínas que pueden utilizarse como marcadores de las distintas etapas de la diferenciación, como las citoqueratinas, la filagrina y la loricrina.

Las citoqueratinas (K) son una familia de proteínas que forman parte del citoesqueleto de filamentos intermedios, constituyendo las principales proteínas estructurales sintetizadas por el queratinocito. Las células de la capa basal se caracterizan por la expresión de las queratinas 5 (K5), y 14 (K14), consideradas como marcadores de queratinocitos con capacidad proliferativa (Fuchs and Green 1980). A medida que el queratinocito migra desde el estrato basal al espinoso, disminuye la expresión de K5 y K14 y se incrementa la expresión de K1 y K10, ambas consideradas marcadores de diferenciación temprana (Fig.1). Otras queratinas como K6 y K16 se expresan en la vaina radicular externa de los folículos y en epitelios estratificados de lengua, paladar o esófago (Moll, Franke et al. 1982, Stark, Breitkreutz et al. 1990). Por último K4 y K13 se expresan en lengua y en epitelios no queratinizados de órganos internos (Sawaf, Shabana et al. 1991). Bajo determinadas situaciones, en estados hiperproliferativos activos como la remodelación tisular que dirige el cierre y la curación de heridas, o en procesos patológicos como el cáncer, se producen cambios en la expresión y/o en la localización de las queratinas, pudiendo observarse expresión de K6 interfolicular, expansión de la expresión de K5/K14, disminución o desaparición de K1/K10, y expresión de queratinas de epitelios simples como K8, acompañada por una disminución de K13 (Franke, Schiller et al. 1981, Larcher, Bauluz et al. 1992). El estrato granuloso se caracteriza por la expresión de proteínas no filamentosas como filagrina y loricrina, considerados marcadores de la diferenciación terminal (Mehrel, Hohl et al. 1990, Steven, Bisher et al. 1990).

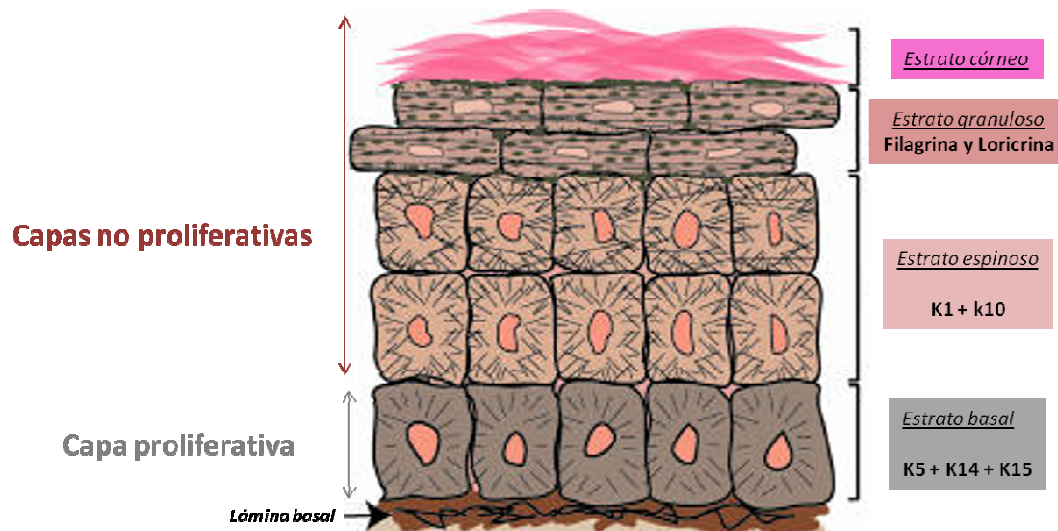


Fig. 1. Estructura de la epidermis. Esquema de la epidermis en el que se representan los estratos que la constituyen, y las proteínas utilizadas como marcadores específicos que se expresan en cada una de ellos (Modificado de Alonso y Fuchs, 2003)

1.2. Las células madre epidérmicas.

Las células madre adultas son las encargadas de mantener la homeostasis de los tejidos. Estas células poseen alto potencial proliferativo y capacidad de autorenovación, manteniendo su propia población y generando otras células más comprometidas capaces de diferenciarse hacia los múltiples linajes celulares del tejido (Weissman, Anderson et al. 2001, Blanpain and Fuchs 2006).

En la epidermis de ratón, la homeostasis se mantiene a partir de células madre interfoliculares (Bonnet and Dick 1997) y a partir de dos tipos de poblaciones localizadas en los folículos pilosos (HF), los precursores de glándulas sebáceas localizadas en el *isthmus* de los HFs y las células madre foliculares (HF-SC), localizadas en un compartimento anatómicamente aislado situado debajo de la glándula sebácea denominado *bulge* (Cotsarelis, Kaur et al. 1999, Alonso and Fuchs 2003) (Fig. 2). Estas HF-SC presentan una alta capacidad proliferativa, y están encargadas de formar las diferentes capas de los HFs durante las distintas fases de la formación del pelo, que alterna periodos de crecimiento activo (anagén), con periodos de quiescencia y destrucción (telogén y catagén, respectivamente) (Blanpain and Fuchs 2006). Al comienzo de cada ciclo del pelo, las células madre del *bulge* son estimuladas a proliferar, salir del nicho y diferenciarse formando los distintos tipos de células maduras del HF.

Las HF-SC son capaces de actuar como células multipotentes y contribuir a la regeneración de la piel interfolicular en condiciones en las que la integridad de la piel se ve comprometida, como en la reparación de lesiones o heridas (Taylor, Lehrer et al. 2000, Ito, Liu et al. 2005). Además, son capaces de diferenciar a glándula sebácea en condiciones de

hiperproliferación (Horsley, O'Carroll et al. 2006). A pesar de que las células madre del *bulge* tienen la capacidad de diferenciarse en los múltiples linajes de la epidermis, en condiciones normales esta capacidad se ve restringida como consecuencia, probablemente, de señales microambientales que condicionan la diferenciación en los distintos linajes (Blanpain, Horsley et al. 2007).

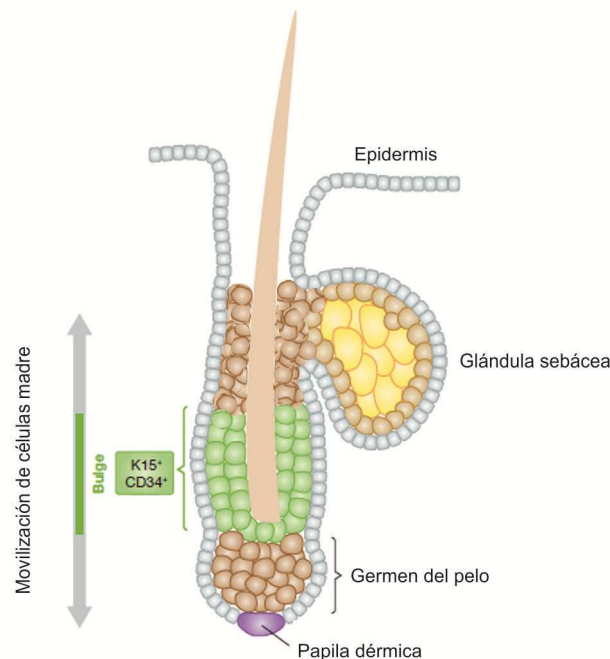


Figura 2. Esquema del folículo piloso. Descripción de las estructuras de un folículo piloso entre las que destaca la localización del bulge (verde), que alberga células madre foliculares multipotentes donde se destacan los marcadores característicos K15 y CD34 (Modificada de Horsley, 2011).

La identificación de marcadores moleculares específicos de estas poblaciones de células madre ha sido básica a la hora de su aislamiento y caracterización. La identificación de las HF-SC se ha realizado aprovechando la característica de su bajo índice de proliferación, mediante experimentos de retención de marca (LRC). En estos experimentos se cuantifican las células que tras dar un pulso de BrdU o Timidina-tritiada, mantienen la marca en la nueva hebra de ADN sintetizada tras un largo periodo de tiempo. En ratón, la mayoría de estas células se localizan en el *bulge* (Cotsarelis, Sun et al. 1990, Taylor, Lehrer et al. 2000). Otros marcadores de HF-SC son la integrinas $\alpha 6$ y $\beta 1$, las queratinas K19 y K15 (si bien, también son expresados en menor medida por otros queratinocitos) (Lyle, Christofidou-Solomidou et al. 1998, Liu, Lyle et al. 2003) (Fig. 1 y 2) y el marcador de célula madre hematopoyética CD34 (Trempus, Morris et al. 2003) que es exclusivo del *bulge* de ratón (Cotsarelis 2006, Solanas and Benitah 2013) (Fig. 2).

Se ha determinado que los niveles relativos de Wnt/ β -catenina y del morfógeno BMP, son esenciales en el mantenimiento de la quiescencia y en la activación de las células madre epidérmicas (Kobielak, Stokes et al. 2007, Lorz, Segrelles et al. 2009), y se ha implicado a varios elementos de la vía de señalización Wnt/ β -catenina en el control de la proliferación y la diferenciación de las células madre adultas hacia los distintos linajes epidérmicos (Lorz, Segrelles et al. 2009).

1.3. Cancer y desarrollo tumoral.

Los procesos de proliferación, diferenciación y muerte celular están sometidos a un control estricto y complejo en función de las necesidades del organismo. En general, las alteraciones en el equilibrio entre estos procesos conducen a situaciones patológicas entre las que se encuentra el cáncer. El cáncer es un proceso de múltiples fases que implica la acumulación sucesiva de una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas que se producen en la célula iniciadora y conducen a la transformación progresiva de células normales en células tumorales (Hanahan and Weinberg 2000, Hanahan and Weinberg 2011). Se ha descrito que durante el desarrollo tumoral, las células alteradas van adquiriendo una serie de capacidades biológicas que les confieren una ventaja selectiva frente a las células normales, que las habilitan para el crecimiento y desarrollo del tumor (Hanahan and Weinberg 2011) (Fig.3).

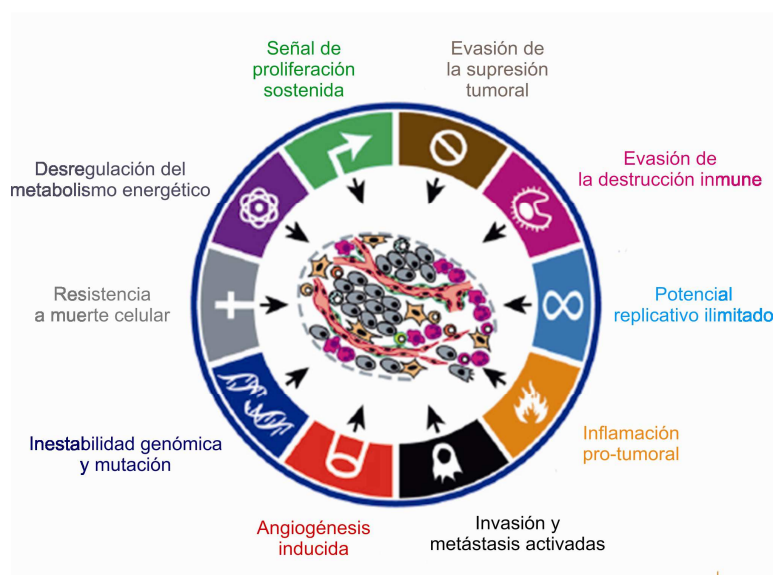


Fig.3. Señales de identidad del cáncer. Ilustración que recoge las múltiples capacidades adquiridas e identificadas en las células tumorales, necesarias para el crecimiento y progresión del tumor (Modificada de Hanahan y Weinberg, 2011).

Las alteraciones responsables del desarrollo tumoral afectan principalmente a tres tipos de genes: los proto-oncogenes, los supresores de tumores y los implicados en la reparación del ADN. Los proto-oncogenes, cuyas formas mutadas se denominan oncogenes, presentan un comportamiento dominante es decir, mutaciones en uno de los dos alelos son suficientes para producir alteraciones en la célula. Además, en muchas ocasiones la mera amplificación de estos genes es suficiente para producir la transformación celular. En general, los proto-oncogenes están implicados en vías que controlan la proliferación y la apoptosis. Los genes supresores de tumores controlan el crecimiento excesivo de las células, y sus mutaciones ocasionan una disminución en la actividad del producto del gen al que afectan. En general tienen un comportamiento recesivo, siendo necesaria la alteración de los dos alelos del gen para que se produzca la pérdida de función. En algunos supresores tumorales se han descrito fenómenos de haplosuficiencia, en estos casos la pérdida de uno de los dos alelos es suficiente para producir la pérdida de función (Santarosa and Ashworth 2004). Los genes de reparación del ADN, son los responsables de corregir los errores que se producen durante el proceso de replicación del ADN, o los daños producidos por agentes físicos o químicos. Su correcto funcionamiento mantiene las alteraciones genéticas al mínimo (Vogelstein and Kinzler 2004). Alteraciones en oncogenes y en genes supresores tumorales, pueden conducir a una inestabilidad genética favoreciendo el desarrollo tumoral. En esta tesis se analizan las consecuencias de eliminar el supresor tumoral Retinoblastoma (pRb) y el inhibidor de ciclo celular p21 en los epitelios estratificados.

Durante la progresión tumoral epitelial, se distingue una secuencia de alteraciones histológicas: hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo y metástasis (Fig. 4). El epitelio hiperplásico, se caracteriza por un engrosamiento del epitelio debido al estado hiperproliferativo de las células que son morfológicamente normales y preservan la estructura del tejido. En el epitelio displásico, las células muestran una morfología alterada y la estructura del tejido está ligeramente perturbada. En el carcinoma *in situ*, las células son muy proliferativas, están desorganizadas y, aunque mayoritariamente están confinadas a su localización original, se observan pequeños focos de rotura de la membrana basal. Los carcinomas invasivos son aquellos en los que las células rompen la membrana basal y comienzan a invadir el tejido subyacente. Algunos de estos carcinomas progresan a carcinomas fusiformes, muy indiferenciados y agresivos a través del proceso de transición epitelio-mesénquima. Finalmente, ocurre la metástasis cuando las células tumorales alcanzan los vasos sanguíneos o linfáticos, viajando a otros órganos donde anidan y producen el desarrollo de nuevos tumores (metástasis distal). Las metástasis son las responsables del 90% de todas las muertes relacionadas al cáncer (Sporn 1996) (Fig. 4).

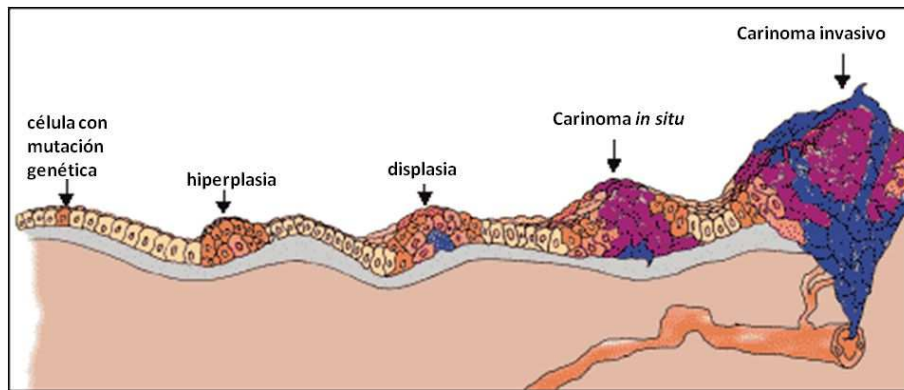


Fig. 4. Fases del desarrollo tumoral. Célula mutada, hiperplasia, displasia, carcinoma in situ y carcinoma invasivo, que finalmente adquiere la capacidad de migrar hacia otras localizaciones.

Aunque se considera que los tumores tienen un origen clonal, se sabe que son heterogéneos y que no todas las células que los forman tienen las mismas características. En este sentido, existe una evidencia cada vez mayor de que tanto el crecimiento del tumor primario como la formación de la metástasis, se van a producir a partir de una pequeña subpoblación de células denominadas células madre cancerosas. Las células madre cancerosas presentan características similares a las células madre adultas, como la capacidad de autorenovarse, de diferenciarse en distintos tipos celulares y de permanecer vivas y quiescentes (sin dividirse) durante largo tiempo. Esto ha planteado la hipótesis de que estas células pudieran surgir de poblaciones de células madre adultas, como consecuencia de alteraciones oncogénicas que afectan a rutas moleculares encargadas del control homeostático, como son las vías Wnt, Notch y Hedgehog, y de la Fosfatidil-Inositol 3 quinasa/Akt (PI3K/Akt) (Lorz, Segrelles et al. 2009). Estas vías se encuentran alteradas en una gran variedad de tumores humanos (Reya and Clevers 2005, Rubin and de Sauvage 2006).

1.4. Tipos de tumores epidérmicos.

Las células epiteliales proliferan activamente debido a su constante renovación. Además, dada su localización se encuentran más expuestas que otros tipos celulares a los agentes dañinos del medio ambiente. Esto explicaría el hecho de que el 80% de todos los tumores tenga un origen epitelial, denominándose carcinomas.

El cáncer epidérmico no melanoma representa más del 50% de los tumores que se diagnostican anualmente (GLOBOCAM 2012). Engloba diferentes tumores, entre los cuales se incluyen el carcinoma de células basales (CCB) (Fig. 5), el carcinoma de células escamosas (CCE) (Fig. 5), el tricofoliculoma, el pilomatricoma y el adenoma sebáceo. Los CCBs y los CCEs son los tumores más frecuentes. El CCB es el mayoritario y aparece frecuentemente en personas de edad avanzada. Se caracteriza por células que se asemejan a las normales del estrato basal,

crecen lentamente, y rara vez sufren metástasis. El segundo tipo de tumor de piel más frecuente es el CCE con más de 500.000 casos diagnosticados al año en todo el mundo. Los CCEs son tumores más agresivos, con alta capacidad de infiltración y metástasis. Histológicamente, los CCEs bien diferenciados recapitulan una diferenciación similar a la de un epitelio estratificado, en los que se distingue los estratos basales y suprabasales. Los CCEs pueden desarrollarse en diversas localizaciones de los epitelios estratificados: piel, esófago, laringe, cérvix, cavidad oral, y por metaplasia, en pulmón o mama. El 80% de los carcinomas de piel surgen en las zonas expuestas al sol, siendo la radiación ultravioleta (UV) el agente mutagénico más importante.

En relación a las vías moleculares implicadas en el desarrollo de estos tumores, las alteraciones en los genes pertenecientes a la vía molecular *Hedgehog* (Hh) se han asociado al desarrollo de CCBs (Oro, Higgins et al. 1997, Hutchin, Kariapper et al. 2005). En cuanto a los CCEs, se ha demostrado que las mutaciones en p53 asociadas a la radiación ultravioleta es una de las primeras alteraciones observadas en las lesiones pretumorales (Brash, Rudolph et al. 1991). En este sentido, los animales deficientes en p53 en epidermis desarrollan CCEs espontáneos (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008, Bornachea, Santos et al. 2012). Se han reportado como alteraciones más frecuentemente implicadas en el desarrollo de estos tumores, la activación del Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR), la activación de la vía Ras-Raf-MEK-MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos) (Uribe and Gonzalez 2011), la activación de la vía del Factor Nuclear κ B (NF κ B), de la vía de PI3K/Akt (Segrelles, Ruiz et al. 2002) y del factor de transcripción STAT3 (Jost, Kari et al. 2000, Quadros, Peruzzi et al. 2004). Además, se ha establecido el papel esencial de CD34 (Trempeus, Morris et al. 2007), y la implicación de Wnt/ β -catenina en el mantenimiento de las células madre tumorales en CCEs (Malanchi, Peinado et al. 2008).

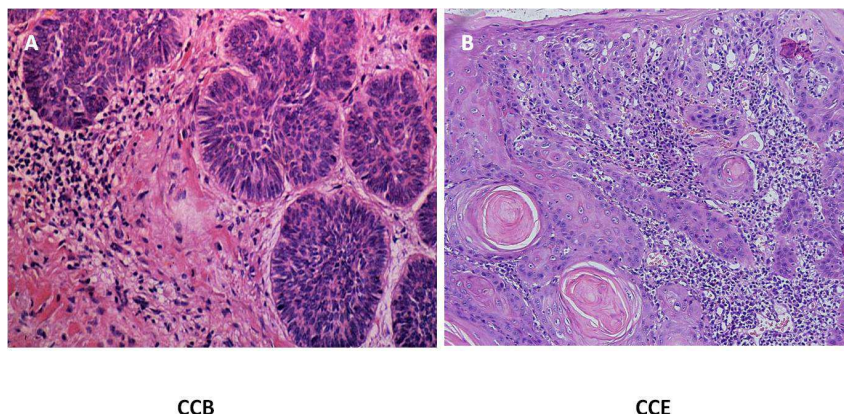


Fig. 5. Cáncer de piel no melanoma. Ejemplos histológicos de los dos tipos de tumores epiteliales no melanoma más frecuentes. A) Carcinoma de Células Basales (CCB). B) Carcinoma de Células Escamosas (CCE).

1.5. La epidermis de ratón como sistema modelo.

La epidermis es un tejido fácilmente accesible y manipulable, que permite el aislamiento de biopsias y una monitorización *in vivo* continuada de cualquier lesión o tumor en estudio. La epidermis de ratón es un sistema modelo ideal para el estudio de los procesos de proliferación y diferenciación, ya que se encuentran perfectamente compartimentados por su disposición estratificada, y pueden ser caracterizados por marcadores específicos como las queratinas. En este sentido, el aislamiento y caracterización de las secuencias reguladoras de la expresión de queratinas ha permitido dirigir específicamente la expresión de genes de interés a las distintas capas de la epidermis de ratones modificados genéticamente (Sinha and Fuchs 2001). Otra ventaja que ofrece, es la posibilidad de aislar queratinocitos que pueden utilizarse para establecer cultivos primarios, o para realizar trasplantes de piel en receptores inmunodeficientes. Finalmente, para el estudio de los procesos tumorigénicos en la epidermis, ha sido de gran utilidad el empleo de modelos animales donde se han establecido protocolos de carcinogénesis química inducida que permiten el análisis secuencial de las alteraciones genéticas y fenotípicas relacionadas con el desarrollo tumoral (DiGiovanni 1992).

2.- Control del ciclo celular.

El ciclo celular eucariota es una secuencia ordenada de eventos mediante los cuales la célula replica su material genético, crece y se divide. Durante el ciclo celular se distinguen dos etapas: interfase y mitosis. La interfase consta de la fase G1, donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas y componentes esenciales para la replicación del ADN, la fase S, donde ocurre la replicación del ADN, y la fase G2, donde la célula se prepara para la mitosis. Bajo determinadas circunstancias, la célula entra en un periodo de latencia (denominado G0) en el que permanece en un estado quiescente, aunque sigue presentado un metabolismo activo. El ciclo celular está perfectamente regulado a través de diversos puntos de control donde la célula comprueba su estado permitiendo o no la progresión del mismo (Fig.7). La familia de Retinoblastoma y p21 constituyen dos de los principales sistemas reguladores del ciclo celular.

2.1. La familia Retinoblastoma.

El gen Retinoblastoma, *RB1*, codifica para la proteína pRB, primer supresor tumoral identificado a partir de un tipo de un tumor ocular infantil hereditario denominado Retinoblastoma (Friend, Bernards et al. 1986, Fung, Murphree et al. 1987). pRB es una fosfoproteína nuclear de 105kDa que presenta 16 sitios de fosforilación (Chen, Scully et al.

1989) siendo, junto con p107 (producto del gen *RBL1*) y p130 (producto del gen *RBL2*), el miembro principal de la familia Retinoblastoma. Estas proteínas comparten homología estructural y funcional (Ewen, Xing et al. 1991, Hannon, Demetrick et al. 1993). Su función más relevante es el control de la progresión del ciclo celular a través de la modulación transcripcional (Weinberg 1995, Classon and Harlow 2002).

Los miembros de la familia Retinoblastoma presentan un dominio amino terminal, dos dominios conservados A y B, denominados región *pocket*, separados por una región espaciadora, y una región carboxilo terminal (Fig.6). El dominio *pocket* es primordial para la funcionalidad de estas proteínas ya que sirve como sitio de unión de diversas proteínas celulares como ciclinas, quinasas dependientes de ciclina (CDKs) y factores de transcripción, incluyendo miembros de la familia de factores de transcripción E2F (Lee, Shew et al. 1987, Mayol, Grana et al. 1993). Esta región conservada también puede unirse a oncoproteínas virales, como el antígeno T de SV40, la proteína E1A de adenovirus y la proteína E7 del virus del papiloma humano (VPH), lo que conduce a la liberación de los factores E2F (Whyte, Buchkovich et al. 1988, Dyson, Howley et al. 1989, Ewen, Ludlow et al. 1989, Horowitz, Yandell et al. 1989, Munger, Werness et al. 1989). Se han identificado 8 miembros de la familia de E2F. Estos factores poseen dominios de transactivación y de represión transcripcional. Cuando se unen a los miembros de la familia Retinoblastoma median la represión transcripcional, mientras que cuando se liberan pueden actuar como transactivadores. Las principales diferencias entre pRb, p107 y p130 radican en sus patrones de expresión diferencial durante el ciclo celular, y en su diferente capacidad de unión a los distintos miembros de la familia de E2F. Los factores activadores E2F1, 2 y 3a se asocian preferentemente a pRb, mientras que los represores E2F3b-5 lo hacen principalmente con p107 y p130 (Classon and Dyson 2001).

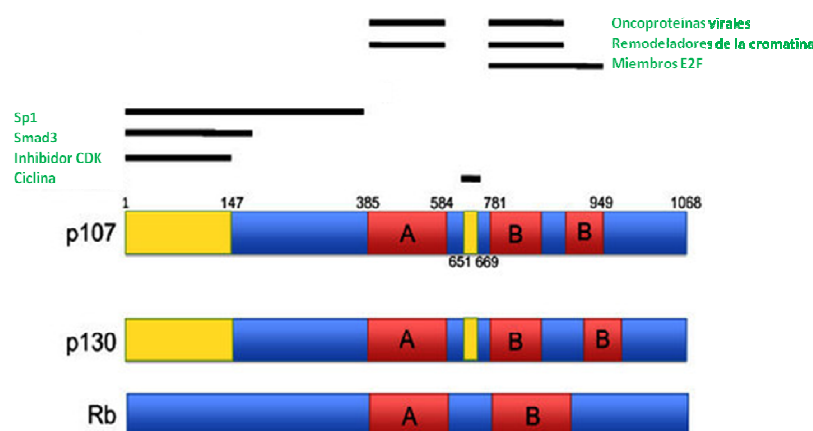


Fig. 6. Esquema estructural de los dominios compartidos por los miembros de la familia Retinoblastoma. Las líneas negras representan las áreas de interacción con proteínas específicas (modificado de Wirt y Sage, 2010).

2.1.1. Implicación de pRb en el control del ciclo celular.

pRb en su estado activo (hipofosforilado) inhibe la proliferación celular controlando negativamente la transición de la fase G1 a la fase S del ciclo celular (Weinberg 1995, Sherr and McCormick 2002, Burkhart and Sage 2008) mediante la inhibición de la familia de factores de transcripción E2F, lo que impide la transcripción de genes esenciales para la replicación del ADN en la fase S (Dyson 1998, Chen, Tsai et al. 2009)(Fig.7). Durante la progresión normal del ciclo celular, la proteína pRB es funcionalmente inactivada por fosforilaciones llevadas a cabo por complejos de ciclinas/quinasas dependientes de ciclinas (CDKs) (Lee, Shew et al. 1987, Mayol, Grana et al. 1993, Sherr and Roberts 1999, Malumbres and Barbacid 2001, Malumbres and Barbacid 2009). Como consecuencia de la fosforilación de pRB, se produce la liberación de los factores E2F promoviendo la transcripción de genes implicados en el avance de ciclo celular. A su vez, todo este sistema está regulado negativamente por los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas (CKIs), que impiden la formación o inhiben los complejos ciclina/CDKs (Harper and Elledge 1996).

Múltiples factores pueden ocasionar una incorrecta regulación del ciclo celular permitiendo su progresión incontrolada. Así, el aumento en la expresión o mutación en ciclinas o en CDKs, la inactivación de CKIs, la unión de oncoproteínas virales a pRB, o la inactivación génica del gen *RB1*, conllevan a la liberación de los factores E2F iniciando la transcripción de genes implicados en la replicación del ADN y en el control de varias actividades del ciclo celular, pudiendo ocasionar en último término alteraciones patológicas como el cáncer (Johnson and Schneider-Broussard 1998).

Aparte de sus funciones reguladoras sobre el ciclo celular, las proteínas de la familia de Retinoblastoma están involucradas en otros procesos celulares como diferenciación, apoptosis, angiogénesis o en la transcripción génica que regula la senescencia (Condorelli, Testa et al. 1995, Gabellini, Del Bufalo et al. 2006, Khidr and Chen 2006, Chicas, Wang et al. 2010, Hilgendorf, Leshchiner et al. 2013). Algunas de estas funciones están mediadas por su interacción directa con los miembros de la familia de E2F, o de forma indirecta reclutando corepresores o activadores para factores de transcripción específicos, o modificadores que regulan la estructura de la cromatina (Claudio, Stiegler et al. 2001, Trimarchi and Lees 2002, Costa, Paramio et al. 2013).

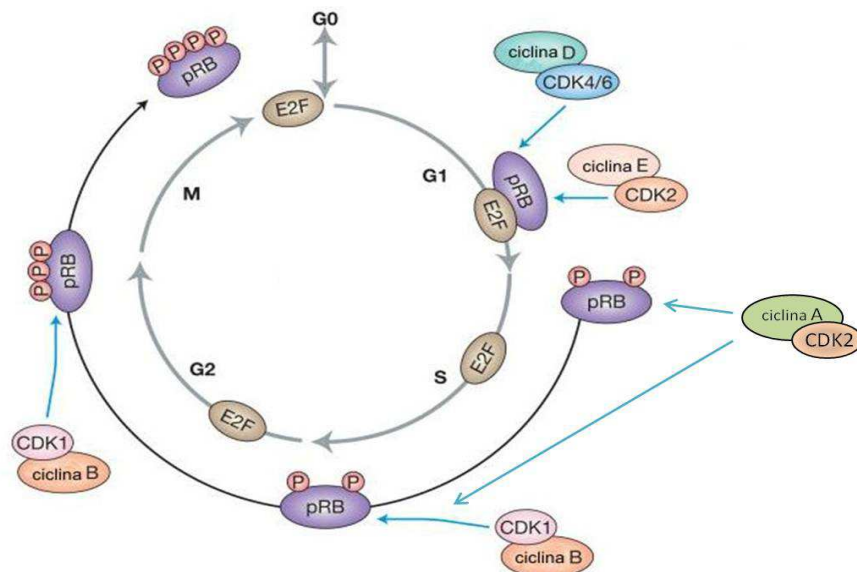


Fig. 7. Esquema del ciclo celular. Representación de las distintas etapas del ciclo celular: G1, S, G2 y M. Los complejos ciclina D/CDK4 y 6, ciclina E/CDK2 y ciclina A/CDK2, inician la fosforilación de pRB controlando la transición G1/S del ciclo. Los complejos ciclina B/CDK1 prosiguen con la fosforilación secuencial de pRB participando en la transición S/G2 del ciclo. Estas fosforilaciones permiten la liberación de los factores E2F que activan la transcripción génica necesaria para la replicación del ADN y la progresión del ciclo celular (modificada de Moghadam, Hanks et al., 2011).

2.1.2. Papel de pRb en la epidermis y en el desarrollo tumoral epitelial.

En tumores humanos, el gen *RB1* se encuentra mutado con una frecuencia relativamente baja. Sin embargo, la proteína pRB se encuentra inactivada funcionalmente en la práctica totalidad de los tumores como consecuencia de alteraciones en el eje (pRB/ciclina/CDK/INK4) que controla su actividad (Goodrich 2006, Hanahan and Weinberg 2011). La implicación de la vía de Retinoblastoma en el desarrollo tumoral epidérmico se ha demostrado en múltiples estudios (Rodríguez-Puebla, LaCava et al. 2000, Paramio, Segrelles et al. 2001, Sotillo, Dubus et al. 2001, Wang, Russell et al. 2001). En estos estudios ha sido fundamental la utilización de modelos animales modificados genéticamente. Los animales deficientes en *Rb1* son letales embrionarios entre los días 13,5-15,5 de desarrollo. Estos animales presentan un aumento en la proliferación y en la apoptosis en retina, sistema nervioso central e hígado; además de presentar una hematopoyesis defectuosa (Clarke, Maandag et al. 1992, Jacks, Fazeli et al. 1992, Lee, Chang et al. 1992). La morfogénesis de la epidermis comienza en torno al día 14,5 de gestación, lo que imposibilita la utilización de este modelo para estudiar su papel en la epidermis. Para eludir este problema, se ha recurrido a la inactivación específica de *Rb1* en la capa basal de los epitelios estratificados empleando la tecnología Cre/LoxP (Sauer and Henderson 1988). Para ello, se cruzaron ratones transgénicos portadores de la secuencia LoxP flanqueando el exón 19 de *Rb1* (Vooijs, te Riele et al. 2002) con ratones que expresaban la recombinasa Cre bajo el promotor de la K14 (Meuwissen,

Jonkers et al. 2001). El fenotipo de estos animales, mostró que la deficiencia de pRb en epidermis de ratón ($pRb^{\Delta Epi}$) promueve un incremento proliferativo y ocasiona alteraciones en la diferenciación que conducen a una hiperplasia e hiperqueratosis epidérmica moderada, pero no al desarrollo de tumores espontáneos (Ruiz, Santos et al. 2004), debido en parte a la compensación funcional mediada por p107 (Ruiz, Santos et al. 2004, Lara, Garcia-Escudero et al. 2008). De hecho, la pérdida de uno o ambos alelos de p107 agrava el fenotipo de los animales $pRb^{\Delta Epi}$ de forma dependiente del número de copias de p107 (Ruiz, Santos et al. 2004). Por otro lado, los animales $pRb^{\Delta Epi}$ sometidos a protocolos de carcinogénesis química en piel (DMBA/TPA) muestran un número menor de tumores que los animales controles, pero con un mayor grado de malignidad (Ruiz, Santos et al. 2005). Esto es consecuencia de una mayor inducción de p53 en los tumores benignos (papilomas) de los animales $pRb^{\Delta Epi}$. Dicha inducción genera una presión selectiva que conduce a la pérdida prematura de p53, lo que a su vez acarrea la malignización tumoral (Ruiz, Santos et al. 2005, Ruiz, Santos et al. 2006). De hecho, la pérdida de p53 en epidermis es suficiente para el desarrollo tumoral (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008, Martinez-Cruz, Santos et al. 2009) y la metástasis a través de procesos de transición epitelio mesénquima (Bornachea, Santos et al. 2012). La doble deficiencia de pRb y p53 en la epidermis de ratón ($pRb^{\Delta Epi}; p53^{\Delta Epi}$), no agrava el fenotipo epidérmico de los ratones $pRb^{\Delta Epi}$, pero conduce a una aceleración en el desarrollo tumoral en comparación con los animales $p53^{\Delta Epi}$ (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008, Martinez-Cruz, Santos et al. 2009).

2.2. p21, modulador del ciclo celular.

El transcurso del ciclo celular está regulado por la acción de los complejos ciclinas/CDKs cuya actividad está controlada por la función inhibitoria de dos grandes grupos de CKIs: la familia INK4, que comprende los inhibidores p16, p15, p18 y p19, que actúan preferentemente sobre CDK4 y CDK6, y los miembros de la familia Cip/Kip, que comprende los inhibidores p27, p57 y p21, que afectan a cualquiera de los complejos ciclina/CDK (el-Deiry, Tokino et al. 1993, Harper, Adami et al. 1993, Xiong, Hannon et al. 1993, Johnson, Dimitrov et al. 1994, Sherr and Roberts 1999).

El gen *CDKN1A* codifica para la proteína de 21kDa $p21^{Waf1/CIP1}$ (en adelante, p21). p21 es un CKI cuya estructura proteica posee importantes dominios de interacción. En las proximidades del extremo amino-terminal, se distingue un motivo de unión para las ciclinas (denominado Cyc1) y el sitio de unión de CDKs. En el extremo carboxiterminal, se localizan la región de unión al Antígeno de Proliferación Celular Nuclear (PCNA), la Secuencia de

Localización Nuclear (NLS) y otro sitio de unión de ciclinas (Cyc2) (Fig. 8). p21 interacciona adicionalmente con múltiples proteínas requeridas en diversos procesos biológicos importantes para la célula como por ejemplo, procaspasa 3, PARP-1, MDM2, CMYC, E2F1, etc (Dotto 2000, Kitaura, Shinshi et al. 2000, Roninson 2002, Devgan, Mammucari et al. 2005).

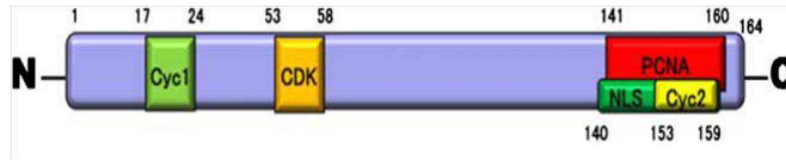


Fig.8. Mapa de la proteína p21 mostrando sus principales dominios de interacción: motivos de unión a ciclinas (Cyc1 y Cyc2), CDKs, PCNA y NLS. Los números en negrita hacen referencia a la posición de aminoácido que ocupan. N- señala el extremo aminoterminal y C señala el extremo carboxiterminal de la proteína (Cazzalini, Scovassi et al. 2010).

2.3. Funciones de p21.

p21 es principalmente una diana transcripcional del supresor p53, que se induce en respuesta a múltiples estímulos como daño en el ADN, estrés oxidativo, en respuesta a citoquinas, tras la infección por virus tumorales, o procesos de senescencia (Abbas and Dutta 2009), y se sabe que es necesaria para la represión de genes reguladores de la progresión del ciclo celular dependientes de p53 (CDC25, CHK1, CCNB1, TERT, entre otros) (Lohr, Moritz et al. 2003). Además de su función principal como modulador de la progresión del ciclo celular, interviene en otros procesos claves como la diferenciación y la reparación de daño en el ADN (Fig. 9).

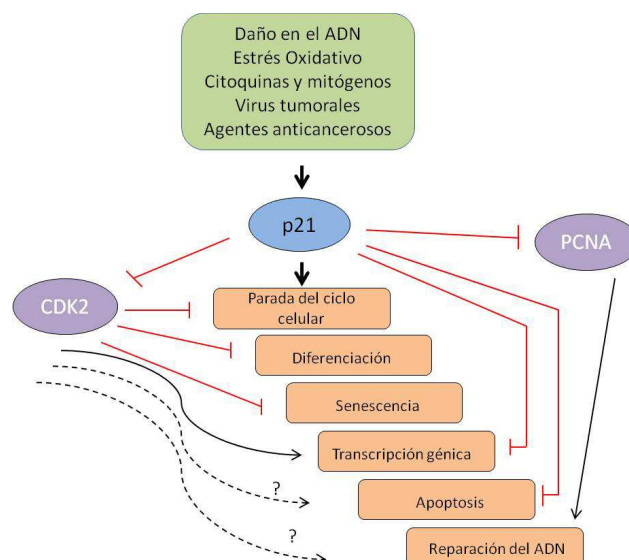


Fig.9. Papel central de p21. p21 responde a una variedad de estímulos que inducen actividades inhibitorias que dependen principalmente de su habilidad para promover la parada de ciclo celular, inhibiendo la actividad de CDK2 o bloqueando PCNA. Algunas actividades antiproliferativas recaen sobre sus múltiples interacciones proteína-proteína y su capacidad para regular la transcripción génica. Promueve la reparación del ADN y ejerce actividades antiapoptóticas. Además, regula la expresión de ciertos genes promoviendo la senescencia (modificada de Abbas y Dutta, 2009).

Cabe destacar finalmente, que en diversos tipos celulares se ha reportado la inducción de *Cdkn1a* independiente de p53 (Macleod, Sherry et al. 1995, Parker, Eichele et al. 1995). Se ha observado inducción por unión directa al promotor *Cdkn1a* de receptores hormonales (retinoico, vitamina D y receptores de andrógenos) (Gartel and Tyner 1999, Abbas and Dutta 2009), o por unión de diversos factores de transcripción (SP1, SP3, AP2, KLF4, KLF6, entre otros) (Li, Yea et al. 2005, Rowland and Peeper 2006).

Durante el ciclo celular p21 interacciona con los complejos ciclina/CDK, ejerciendo un efecto positivo o negativo de la progresión de la fase G1/S en función de sus niveles proteicos (Sherr and Roberts 1999). Niveles fisiológicamente bajos permiten y favorecen el ensamblaje y activación de los complejos ciclina/CDKs, mientras que los niveles elevados de la proteína provocan un bloqueo en la actividad de las CDKs (Fig. 10).

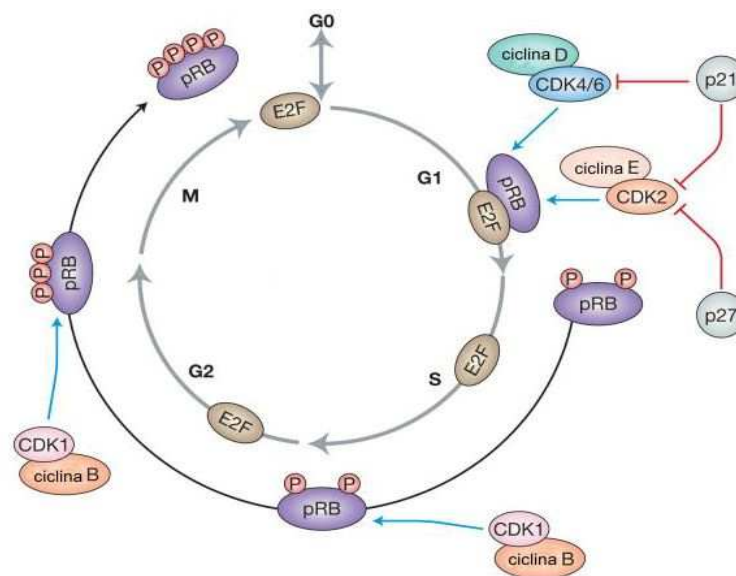


Fig.10. Regulación del ciclo celular. Los CKIs como p21, constituyen otro nivel de regulación del ciclo celular bloqueando los complejos ciclina/CDK. Esto posibilita la presencia de formas activas pRb, inhibiendo el avance del ciclo principalmente en la transición de la fase G1 a S (Moghadam, Hanks et al., 2011).

p21 tiene un importante papel como modulador de la apoptosis (Fig. 9), ejerciendo funciones tanto proapoptóticas como antiapoptóticas. Las funciones antiapoptóticas se producen en respuesta a diversos estímulos como la ausencia de factores de crecimiento, sobreexpresión de p53 o durante algunos procesos de diferenciación. Esta acción la realiza por unión directa a proteínas implicadas en los procesos apoptóticos (procaspasa-3, caspasa 8 y caspasa10), regulando la expresión de genes que codifican para factores antiapoptóticos (Abbas and Dutta 2009), o suprimiendo la inducción de genes pro-apoptóticos como *MYC* y *E2F1* (Dotto 2000). En base a esta función antiapoptótica se le ha otorgado un papel como

oncogén, que será discutido en el siguiente apartado (Gartel 2006). Las funciones pro-apoptóticas de p21 se ejercen mediante: la inducción de la proteína pro-apoptótica BAX, la activación de miembros de la familia del Factor de Necrosis Tumoral (TNF), la activación de receptores de muerte, o como consecuencia de los mecanismos de reparación de daño en el ADN (Gartel 2005). Estos procesos pueden ser dependientes o independientes de p53. Los efectos pro-apoptóticos o anti-apoptóticos de p21 parecen depender del tipo de estímulo y de su localización celular. Si bien la presencia de p21 en el núcleo favorece la apoptosis, los niveles elevados de p21 en el citoplasma parecen ser antiapoptóticos, por el bloqueo de la activación de caspasa 3 (Abbas and Dutta 2009).

p21 ejerce también un importante papel modulando los mecanismos de reparación del ADN (Fig. 9). Bajo situaciones de estrés o estímulos que provocan un daño en el ADN, p53 induce la transcripción de p21, lo que permite la parada del ciclo celular y posibilita la reparación del daño en el ADN o la inducción apoptosis (Abbas and Dutta 2009). Dicha parada se debe: a la inhibición de complejos ciclina/CDK, a la unión directa a PCNA, y a favorecer la degradación de ciclina B; afectando a las fases G1, S y G2 del ciclo (Fig. 9). Así, los fibroblastos deficientes en p21 pierden la capacidad de detener el ciclo celular en respuesta a un daño (Deng, Zhang et al. 1995). Además, se ha reportado su implicación en la regulación del proceso de Reparación del ADN por Escisión de Nucleótidos (NER) (Abbas and Dutta 2009, Cazzalini, Scovassi et al. 2010).

2.4. Implicación de p21 en el desarrollo tumoral.

Diversos estudios *in vivo* e *in vitro* relacionan a p21 con el desarrollo tumoral (Brugarolas, Chandrasekaran et al. 1995, Deng, Zhang et al. 1995, Abbas and Dutta 2009). Sin embargo, dicho papel es aún controvertido ya que, si bien en general, se le atribuye un papel como supresor tumoral, existen datos que apoyan un posible papel oncogénico. Esta dualidad parece deberse a su localización celular, actuando como supresor tumoral en el núcleo, y como oncogén (actividad antiapoptótica) cuando se acumula en el citoplasma (Roninson 2002, Gartel 2006). De hecho, datos de tumores humanos reflejan un incremento de los niveles citoplasmáticos de p21, en diversos tipos de cánceres (próstata, cervical, mama y carcinomas escamosos), correlacionándose con tumores agresivos y de peor prognosis (Liu, Bishop et al. 2003, De la Cueva, Garcia-Cao et al. 2006, Gartel 2006, Liu, Yeh et al. 2007, Abbas and Dutta 2009). Aunque por otro lado, datos procedentes de estudios en otros tipos tumorales (colorectales, cervical, microcítico de pulmón y de cabeza y cuello) reportan una reducción en

la expresión de p21, aunque las mutaciones con pérdida de función en el gen *CDKN1A* en los tumores humanos son poco frecuentes (Abbas and Dutta 2009).

Los datos en modelos animales generalmente apoyan el papel de p21 como supresor tumoral. Los animales nulos para p21 desarrollan tumores espontáneos, aunque únicamente a edades avanzadas (Martin-Caballero, Flores et al. 2001) y muestran un incremento en la susceptibilidad tumoral bajo tratamientos de carcinogénesis química (Philipp, Vo et al. 1999, Topley, Okuyama et al. 1999, Jackson, Adnane et al. 2002, Poole, Heap et al. 2004). Además, la deficiencia en p21 coopera con una gran variedad alteraciones oncogénicas *in vivo* como la sobreexpresión de oncogenes *Hras* y *Myc* (Carnero and Beach 2004), o la deficiencia en supresores tumorales como *Apc* (Yang, Mathew et al. 2001, Martin-Caballero, Flores et al. 2004) e *Ink4c* (Franklin, Godfrey et al. 2000), o con otros CKIs como p18^{Ink4} p15 o p27 (Paramio, Segrelles et al. 2001, Garcia-Fernandez, Garcia-Palencia et al. 2011). Además, la eliminación de p21 en fondos genéticos inestables que portan mutaciones en genes que codifican para proteínas implicadas en la reparación del daño en el ADN como ATM o p53, ocasiona un desarrollo tumoral temprano, aberraciones cromosómicas y una marcada aneuploidía (Shen, Heng et al. 2005, Barboza, Liu et al. 2006). Por último, las funciones pro-apoptóticas de p21 también contribuirían a su papel como supresor tumoral (Abbas and Dutta 2009).

Estudios recientes atribuyen a p21 una cierta capacidad oncogénica basada en sus funciones antiapoptóticas. Así, se ha reportado que la eliminación de p21 en ratones nulos para p53 aumenta la supervivencia de los animales como consecuencia del descenso en la aparición de linfomas tímicos. Este descenso se debe a una mayor tasa de apoptosis en las células de los linfomas deficientes en p53 y p21 (De la Cueva, Garcia-Cao et al. 2006). Resultados similares se han obtenido en ratones deficientes en p21 y *Atm* (Wang, Elson et al. 1997). Por otro lado, se ha observado que bajo determinadas condiciones p21 promueve la unión de ciclina D1 a CDK4 y/o CDK6 sin inhibir su actividad quinasa (LaBaer, Garrett et al. 1997, Liu, Yeh et al. 2007), y protege a ciclina D1 de su degradación aumentando la proliferación celular, lo que indicaría un posible papel oncogénico (Alt, Gladden et al. 2002).

p21 también está relacionada con el mantenimiento de las células madre influyendo en su estado proliferativo, funcionalidad y capacidad de auto renovación tras ser sometidas a una situación de estrés. Nuevamente se observa un comportamiento dual en este caso. Por un lado, p21 protege a las células madre adultas sometidas a un daño agudo por estrés genotóxico, ya que previene su entrada en el ciclo celular, promoviendo su estabilidad

genómica. Por el contrario, en un contexto de daño persistente y crónico, acumulado durante el tiempo, esta función de p21 no es ventajosa ya que promueve el mantenimiento de las células madre dañadas, otorgándoles un posible papel oncogénico (Choudhury, Ju et al. 2007, Liu, Elf et al. 2009, van Os, de Haan et al. 2009).

2.5. Relación de p21 y la familia Retinoblastoma.

Existen datos que apoyan el hecho de que p21 comparte funciones implicadas en la regulación del ciclo celular con la familia Retinoblastoma. Así, la secuencia consenso de unión a ciclinas es común para p21, p107 y p130, por lo que p21 puede competir con p130 y p107 por la unión a los complejos ciclina/CDKS, limitando así la fosforilación mediada por estos complejos sobre los miembros de la familia de Retinoblastoma (Saha, Eichbaum et al. 1997). Otras características compartidas son la unión a factores de transcripción de la familia de E2F (Dotto 2000) y a oncoproteínas virales como E7 del VPH (Funk, Waga et al. 1997).

Tanto pRb como p21 son reguladores negativos de la progresión de la fase G1 del ciclo celular, por lo que podía existir una compensación funcional entre ambas proteínas. En este sentido, fibroblastos carentes de pRb y p21, presentan un ciclo celular descontrolado (Brugarolas, Bronson et al. 1998). Sin embargo, en ausencia de pRb la inhibición de CDK2 mediada por p21 permite la parada en G1. Por último, la deficiencia de p21 en animales *Rb1*^{+/-} acelera la aparición de los tumores sin modificar el tipo y patrón de los mismos (tumores de pituitaria, tiroides y feocromocitomas (Brugarolas, Bronson et al. 1998). En conjunto, estos datos apoyan la existencia de una compensación funcional entre pRb y p21, uno de los objetivos de esta tesis.

3.- Inflamación y respuesta inmune.

La inflamación es un proceso complejo que consiste en el establecimiento de una red de intercambio de señales entre células y factores solubles de un tejido en respuesta al ataque de un agente nocivo, con el fin de recuperar y reconstruir la zona lesionada. El mecanismo de respuesta inflamatoria consiste en la sucesión de varias etapas coordinadas para el reclutamiento de diferentes tipos celulares, lo que implica su activación y migración hacia el lugar de origen del problema fisiológico. Las primeras células efectoras reclutadas en la respuesta inflamatoria son los neutrófilos y/o eosinófilos. A continuación, los factores quimiotácticos hacen migrar a mastocitos y monocitos que más tarde diferenciarán a macrófagos en los tejidos afectados. La llegada de estos tipos celulares facilita la

vasodilatación y la permeabilidad de los vasos. Los macrófagos activados son la principal fuente de liberación de factores de crecimiento, quimioquinas y citoquinas, que influyen en la proliferación y la migración de las células mesenquimales, endoteliales y epiteliales. Las citoquinas y quimioquinas son factores solubles que regulan la migración leucocitaria durante un proceso inflamatorio, poseen un fuerte potencial hiperproliferativo y un alto grado de especificidad para la quimioatracción de poblaciones celulares específicas. Otros tipos celulares importantes que participan en la respuesta inmune, son las células dendríticas y células *Natural Killer* (NK), que pertenecen al sistema de inmunidad innata, y los linfocitos inmaduros y de memoria, a la inmunidad adaptativa (Fridman, Dieu-Nosjean et al.).

La diversidad y especificidad de cada tipo celular inmune viene dada en función de la expresión de sus receptores o moléculas de superficie. Mediante los receptores de superficie, las células inmunes llevan a cabo el reconocimiento del antígeno elaborando la respuesta inmune adecuada, e identifican el tipo, el estado de maduración, el estado de activación y la funcionalidad de la célula inmune (Quintin, Cheng et al. 2014).

3.1. El componente inflamatorio de la piel.

La piel es la primera línea de defensa entre el organismo y el medio contra las agresiones por parte de agentes externos químicos, físicos y microbianos. Para ello establece un sistema de inmunovigilancia mediado por centinelas y efectores inmunes que se encuentran circulando continuamente entre la propia piel, los nódulos linfoides y la circulación sanguínea periférica. En la epidermis, el propio queratinocito actúa como un sensor desarrollando los denominados inflamomas tras la exposición a agentes nocivos, e iniciando así una red de señales inflamatorias. Los queratinocitos presentan receptores de quimioquinas (CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11, etc) y secretan interleuquinas (IL1, IL6, IL10, IL8, TNF α , etc) que modulan la respuesta inmune, atrayendo diferentes tipos celulares hacia la piel. Además, la epidermis cuenta con un tipo de células dendríticas (células de Langerhans) situadas en el estrato espinoso y células T citotóxicas (CD8+), situadas en capa basal. En la dermis, el componente inmune lo forman las células dendríticas, células T CD4+, células T $\gamma\delta$, NK, macrófagos y mastocitos (Fig. 11). Se ha descrito que las células dendríticas actúan como centinelas, las células T específicas de antígeno son efectoras, y que el queratinocito realiza una actividad pro-inflamatoria (Fig.11) (Nestle, Di Meglio et al. 2009).

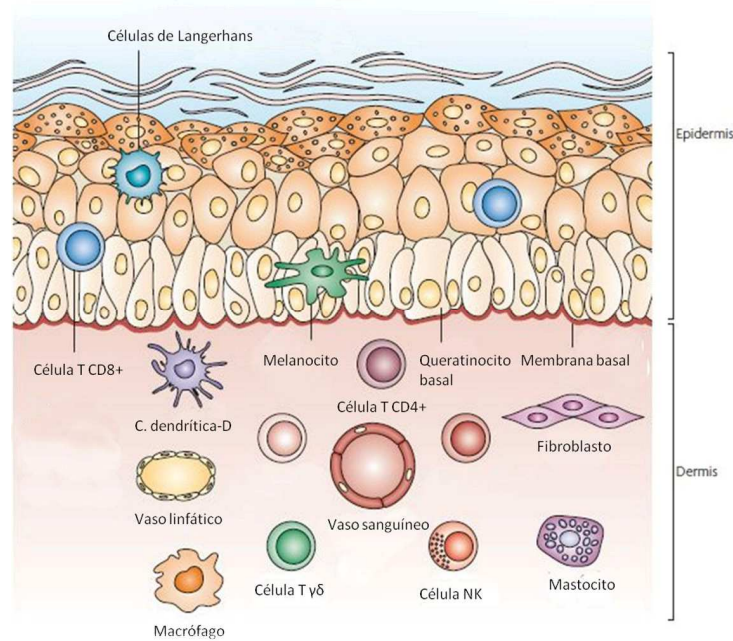


Fig. 11. Componente inmune de la piel. Estructura de la piel donde se distinguen los elementos inmunes específicos de la epidermis, formado esencialmente por células de Langerhans en las capas suprabasales y células T CD8+ en las capas basales, junto al conjunto inmune específico de la dermis formado fundamentalmente por células dendríticas, mastocitos, macrófagos, distintos isotipos de células T CD4+ y células NK (modificado de Nestle, Di Meglio et al., 2009).

Las células T portan receptores de superficie denominados TCRs, cuyos tipos vienen definidos por las cadenas estructurales que lo forman, generadas tras el reordenamiento génico ocurrido en el proceso de maduración que tiene lugar en el timo. Por lo tanto, se puede apreciar una gran diversidad dentro de la población de células T en función del tipo de TCR que expresen. Concretamente, la piel alberga una población fenotípicamente heterogénea de células T, como las células T convencionales que expresan un TCR con cadenas tipo $\alpha\beta$ pertenecientes a la inmunidad adaptativa, y las células T no convencionales que expresan un TCR con cadenas $\gamma\delta$, que pertenecen a la inmunidad innata. En la piel las células T $\alpha\beta$, expresan una gran diversidad de receptores (como CD4, CD8, CD28), que reconocen una vasta mayoría de antígenos externos, y presentan funciones reguladoras (CD4+) y citotóxicas (CD8+). Sin embargo, las células T $\gamma\delta$ epiteliales son más limitadas en cuanto a la expresión de receptores. Se cree que reconocen ligandos propios de estrés o daño específico de tejido, y varios estudios han demostrado que ejercen papeles cruciales en la homeostasis e inmunovigilancia del tejido, incluyendo la reparación de heridas y vigilancia tumoral (Jameson and Havran 2007, Witherden and Havran 2011). En piel se localizan tanto en la dermis como en epidermis y se han descrito en otros tejidos como intestino, lengua, pulmón y aparato reproductor (Witherden and Havran 2011). En general, las células T $\gamma\delta$ son consideradas un tipo de células T dendríticas epidérmicas (CTDEs). En condiciones normales, las CTDEs producen bajos niveles

de citoquinas y factores de crecimiento que contribuyen a la homeostasis epidérmica, pero tras su activación, secretan grandes cantidades de moléculas inflamatorias que participan en la comunicación entre las CTDEs, queratinocitos vecinos y células de Langerhans. En cuanto a la implicación en el desarrollo tumoral, estudios realizados en ratones modificados genéticamente otorgan a las células $T\gamma\delta$ un papel como reguladores negativos de la inflamación y la carcinogénesis, inhibiendo tanto la iniciación como la progresión tumoral, mientras que a las células $T\alpha\beta$ se les atribuye un papel promotor en el desarrollo tumoral (Girardi, Oppenheim et al. 2001, Girardi, Lewis et al. 2002, Roberts, Ng et al. 2007).

3.2. Respuesta inmune, inflamación y desarrollo tumoral.

El control de la respuesta inmune es importante para lograr la integridad de un tejido como la piel. El establecimiento de un proceso inflamatorio normal, como el que ocurre durante la cicatrización de una herida, es auto-limitante y debe existir un equilibrio entre los componentes pro-inflamatorios liberados, y la producción de componentes anti-inflamatorios que atenúen las señales iniciales, y retiren el componente inmune dando terminación al proceso. Una respuesta inmune excesiva o inadecuada, conduce a la generación de enfermedades crónicas inflamatorias y autoinmunes.

La inflamación crónica ocasiona alteraciones celulares consideradas factores carcinogénicos, como estrés oxidativo, mutaciones, cambios epigenéticos y proliferación celular inducida por citoquinas. Bajo estas circunstancias, las células y sus mediadores inflamatorios se convierten en potentes promotores tumorales contribuyendo a la proliferación y supervivencia de las células malignas, a su crecimiento, migración, y metástasis (Fig. 12) (Coussens and Werb 2002, Lin and Karin 2007, Nestle, Di Meglio et al. 2009).

La observación clínica y epidemiológica muestra que pacientes con una enfermedad inflamatoria crónica presentan predisposición e incremento en el riesgo a desarrollar cáncer. Se estima que el 15-20% de las muertes por cáncer a nivel mundial está ligado a la inflamación subyacente. Con frecuencia, estas inflamaciones están causadas por infecciones (Mantovani, Allavena et al. 2008)

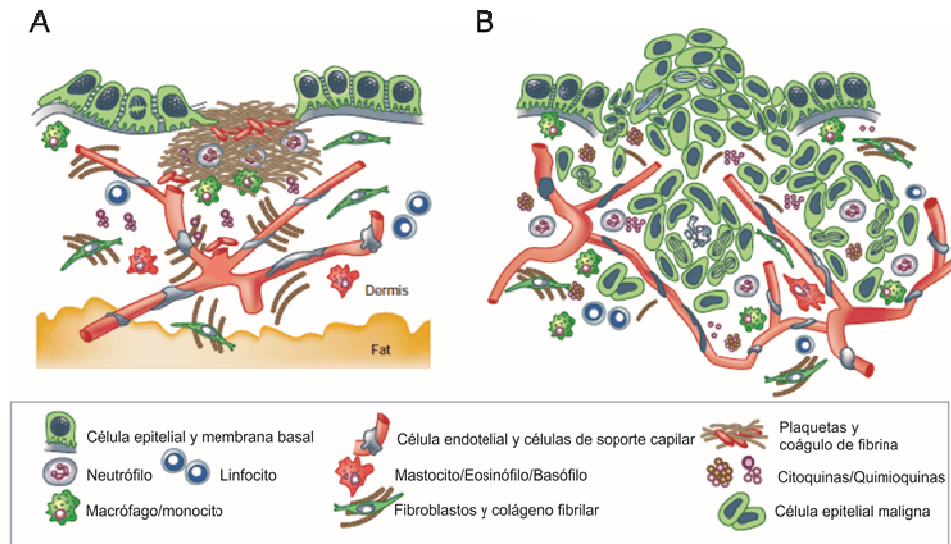


Fig. 12. Similitudes entre un proceso inflamatorio producido durante la cicatrización y el crecimiento de un tumor invasivo. A) Cicatrización normal de una herida donde se establece una comunicación entre las células epiteliales, las del estroma y las células del componente inflamatorio que favorecen la vasodilatación, la formación del tejido de granulación y la remodelación de la matriz extracelular, posibilitando el cierre de la herida. Una vez cicatrizada la herida, la intercomunicación de señales entra en declive para su retirada. B) Carcinoma invasivo donde las células epiteliales neoplásicas producen su propio perfil de citoquinas y quimioquinas mitogénicas y/o quimioatrayentes para granulocitos, mastocitos, monocitos-macrófagos, fibroblastos que secretan enzimas proteolíticas y células endoteliales. Todos estos factores mitogenicos potencian el crecimiento tumoral, angiogénesis e inducen la migración y maduración de fibroblastos, permitiendo la expansión metastásica (modificada de (Coussens and Werb 2002).

Como se ha comentado anteriormente, el desarrollo tumoral surge como consecuencia de alteraciones genómicas que afectan a diversos oncogenes y genes supresores. En relación con el proceso inflamatorio varios tipos de oncogenes intervienen y coordinan los programas transcripcionales implicados en la inflamación, induciendo la producción de citoquinas y quimioquinas. Éstas, además de reclutar células del componente inflamatorio, favorecen el crecimiento, la angiogénesis, la progresión tumoral y la metástasis. Es el caso, de las citoquinas, relacionadas con los resultados de esta tesis, CXCL1, CXCL2, CCL3, CCL1 y TREM.

Alteraciones en las vías de señalización de NFκB y STAT3, implicadas en la producción de citoquinas y quimioquinas por queratinocitos, también pueden alterar la homeostasis de la piel e inducir una patología inmune o tumoral. La actividad de NFκB, esencial para la activación y supervivencia linfocitaria y el establecimiento de respuestas inmunes normales, está asociada, en el caso de activación constitutiva, con enfermedades inflamatorias como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria intestinal, esclerosis múltiple y asma (Li and Verma 2002). La vía de NFκB activa la expresión de genes que codifican citoquinas y quimioquinas, moléculas de adhesión, factores angiogénicos y antiapoptóticos en células inflamatorias y en células transformadas (Maeda, Kamata et al. 2005, Mantovani, Allavena et al. 2008). Además de su implicación en la respuesta inflamatoria, esta vía participa en el desarrollo tumoral

epitelial (Karin 2006, Hayden and Ghosh 2008, Maeda and Omata 2008). Así, el incremento de IKK β (subunidad reguladora positiva de NF κ B) en la capa basal epidérmica de ratones transgénicos, da lugar a una inflamación crónica en piel y a una elevada incidencia en la aparición de tumores orales (Page, Navarro et al. 2010, Page, Cascallana et al. 2011).

El factor de transcripción STAT3 juega un papel esencial en desarrollo, proliferación y respuesta inmune, inhibición de la apoptosis y cierre de heridas, y es considerado como un oncogén (Jang and Baik 2013). En epidermis, la activación constitutiva de Stat3 desarrolla un proceso inflamatorio crónico, semejante en varios aspectos a la psoriasis (Nestle, Di Meglio et al. 2009), y facilita el desarrollo tumoral así como la malignidad (Grandis, Drenning et al. 2000, Schafer and Werner 2008). Por otro lado, la deficiencia de STAT3 en epidermis de ratón, conduce al desarrollo de enfermedades autoinmunes, reducción de la re-epitelización e inhibición del desarrollo tumoral (Reich 2013).

Diversos estudios indican que las células inflamatorias están involucradas en procesos de carcinogénesis, invasión y metástasis (Coussens and Werb 2002, Nathan 2002, Hagemann, Balkwill et al. 2007). Estas células, que en las áreas tumorales se localizan en el centro, los márgenes invasivos o en las estructuras linfoides adyacentes, ejercen un papel importante produciendo mediadores pro-inflamatorios que conducen a la progresión maligna. Por ejemplo, los mastocitos promueven la formación de nuevos vasos sanguíneos. Por el contrario, las células con actividad citotóxica, NK y células T CD8+, atacan al tumor y promueven su eliminación (Nestle, Di Meglio et al. 2009). La expresión de quimioquinas mediada por las células tumorales, que permite el reclutamiento de más células inflamatorias, también participa en este proceso.

3.3. Inmunosupresión tumoral.

Las células tumorales son capaces de modificar la respuesta inmunitaria, lo que les permite expandirse y colonizar al hospedador (Coussens and Werb 2002). Este efecto lo consiguen mediante el mecanismo de inmunosupresión, que consiste en la capacidad de bloquear ciertos tipos celulares antitumorales, células T citotóxicas CD8+ y NK (Hanahan and Coussens 2012). Las células T reguladoras, células mieloides inducidas, células supresoras de derivación mieloide, macrófagos asociados a tumores, neutrófilos o mastocitos, se consideran células con capacidad inmunosupresora que contribuyen a la evasión tumoral.

Otro método de supresión de la respuesta inmune efectiva, es el bloqueo de la diferenciación y activación de células dendríticas, iniciadoras de la respuesta inmune

adaptativa. Estos defectos inmunes están mediados en parte por las Células Supresoras de Derivación Mieloide (CSDMs). Estas células residen en sangre periférica, tejido linfoide y tejido tumoral (Mundy-Bosse, Lesinski et al. 2011). Las CSDMs son células con carácter profundamente inmunosupresor que se encuentran presentes de forma ubicua en pacientes con cáncer y en animales experimentales con tumores malignos. Se caracterizan por la supresión de células T citotóxicas y la promoción de células T reguladoras (Kryczek, Wei et al. 2006, Doedens, Stockmann et al. 2010, Movahedi, Laoui et al. 2010, DeNardo, Brennan et al. 2011). En el ratón, las CSDMs se originan a partir de la médula ósea como progenitores celulares hematopoyéticos Gr1⁺ CD11b⁺, que bajo condiciones normales de diferenciación maduran hacia células dendríticas, macrófagos y/o granulocitos. Los individuos portadores de tumores liberan factores tumorales pro-inflamatorios que bloquean la diferenciación de estas células inmaduras. Estas células inmaduras, se acumulan y retienen en la sangre, órganos linfoides y zonas tumorales del individuo. La inmunosupresión por CSDMs se ha atribuido a alteraciones en la actividad de los macrófagos y en el bloqueo de la citotoxicidad de las NKs y células T citotóxicas del entorno tumoral. Se ha visto cómo las CSDMs facilitan la inmunosupresión mediada por la disminución en la expresión de L-selectina sobre los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, una molécula necesaria para la extravasación y movilidad leucocitaria (Hanson, Clements et al. 2009).

4.- Estrés replicativo y daño en el ADN.

La célula está expuesta a daños producidos por agentes extrínsecos, químicos y físicos, o intrínsecos causados por productos del metabolismo, estrés oxidativo, o por el estrés replicativo producido por la actividad de oncogenes o por la pérdida de función de genes supresores tumorales. Estos agentes pueden ser extremadamente citotóxicos o mutagénicos y causar daño en el ADN. En condiciones normales, la célula detiene su ciclo celular para evaluar la cantidad y el grado de daño sufrido. Si puede repararlo activa los mecanismos necesarios para tal fin, y si no puede repararlos inicia un programa de muerte.

La célula eucariota ha elaborado una serie de mecanismos coordinados de respuesta y reparación del daño en el ADN, con el fin de mantener su integridad y viabilidad (Cimprich and Cortez 2008). Las alteraciones que afectan al correcto funcionamiento de las unidades de reparación causan síndromes severos caracterizados por la degeneración de los tejidos, incidiendo especialmente en el sistema nervioso y el sistema inmune. Además, producen el

aumento de la inestabilidad genética, y por tanto, una mayor predisposición al desarrollo tumoral (Shiloh 2003).

4.1 Mecanismos de reparación de daño en el ADN.

Cuando la célula resulta dañada, la respuesta básica consiste en activar el mecanismo de reparación con el fin de reanudar su ciclo de vida normal. Este mecanismo se encuentra en funcionamiento a lo largo de toda la vida de la célula, y básicamente consiste en una cascada de señalizaciones en la que se coordinan procesos como la transición del ciclo celular, la reparación y replicación del ADN, y el proceso de muerte celular (Shiloh 2003, Lopez-Contreras and Fernandez-Capetillo 2010). En primer lugar, las lesiones en el ADN son detectadas por proteínas sensoras encargadas del inicio de la señalización. Uno de los primeros eventos que ocurren tras el daño en el ADN es la fosforilación en la histona H2AX (H2AX γ). H2AX γ es una isoforma de la histona H2A fosforilada en Ser139, un residuo C-Terminal muy conservado evolutivamente. La activación de la H2AX γ inicia la cascada de señalización llevada a cabo por varias quinasas pertenecientes a la familia de proteínas relacionadas con PI3K (PIKKs). Dos de las proteínas más importantes y directamente implicadas en el mecanismo de respuesta a daño en el ADN, son las quinasas: ATM (Ataxia Telangiectasia Mutada) y ATR (quinasa relativa a ATM y a Rad3). ATM y ATR residen en el núcleo de las células en división, en forma de dímeros o multímeros. Presentan alta homología de secuencia y poseen muchas similitudes bioquímicas y funcionales, además de compartir múltiples sustratos que promueven la parada del ciclo celular y la reparación del ADN, como BRCA1 y p53. Sin embargo, responden a diferentes tipos de daño y no comparten todos los efectores del mecanismo de reparación (Cimprich and Cortez 2008).

En humanos, ATM se autofosforila rápidamente en Ser1981 (en ratón Ser1987), en respuesta a roturas de doble cadena (RDCs), originando múltiples monómeros activos. ATM se activa independientemente de la fase del ciclo celular, aunque se le relaciona preferentemente con la fase G1-S (Cimprich and Cortez 2008) (Fig. 13). ATM fosforila diversos sustratos que ocasionan la activación de los controladores del ciclo celular por diferentes mecanismos. Por un lado y de forma directa, activa p53 mediante fosforilaciones en Ser15 y Ser20, aumentando su actividad transcripcional. También estabiliza p53 de forma directa, por fosforilación en Ser20, o indirecta impidiendo la degradación de p53 al fosforilar e inactivar MDM2. Una vez activada, ATM actúa preferentemente activando la quinasa CHK2 por fosforilación en Thr68 (Bartek and Lukas 2003). CHK2 se expresa de forma estable durante todo el ciclo celular,

aunque en ausencia de daño permanece parcialmente inactivada (Lukas, Bartkova et al. 2001). Su activación posibilita la transmisión de la señal hacia los puntos de control del ciclo celular inhibiendo su progresión. ATM también controla la entrada en fase S del ciclo celular mediante fosforilaciones de CHK1 en Ser345 (Bartek and Lukas 2003, Gatei, Sloper et al. 2003, Sorensen, Syljuasen et al. 2003), otra quinasa que transmite la señalización a los puntos de control del ciclo celular. Tanto CHK1 como CHK2 son capaces de activar p53, con la consiguiente inducción de p21, y de fosforilar y secuestrar a la fosfatasa CDC25, impidiendo en ambos casos la progresión del ciclo celular (Fig. 13) (Falck, Mailand et al. 2001, Mailand, Podtelejnikov et al. 2002, Zhao, Watkins et al. 2002). Se ha descrito que ATM fosforila y estabiliza E2F (Shiloh 2003), lo que conlleva a un aumento de la actividad de p53, y se ha reportado que ATM estimula la actividad de p53 en respuesta a E2F, mediante una fosforilación adicional en CHK2 (Powers, Hong et al. 2004).

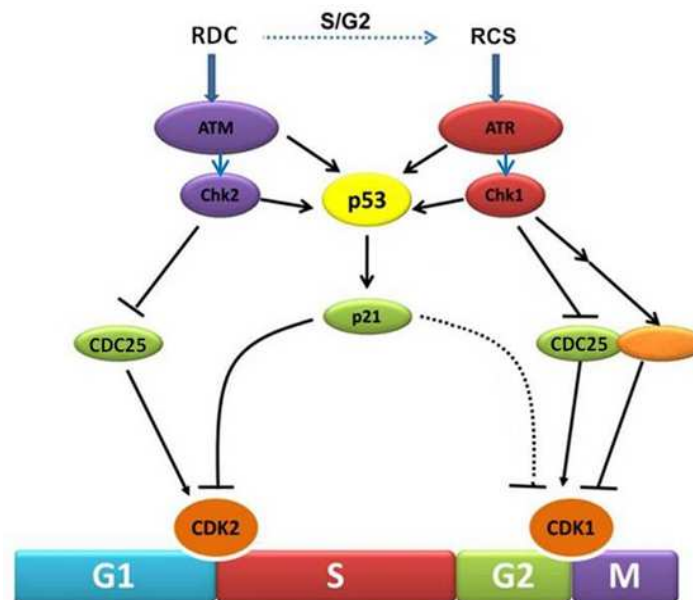


Fig. 13. Esquema de la cascada de señalización en respuesta a daño en el ADN. Tras un daño en el ADN, se induce una cascada de señalización principalmente dirigida a provocar la parada del ciclo celular.

ATR se activa en respuesta a diferentes tipos de daño: RDCs, bases alteradas, entrecruzamientos, estrés replicativo y roturas de cadena simple del ADN (RCSs), donde el reconocimiento de los lugares del daño depende de la colocalización de un conjunto de proteínas estabilizadoras que forman complejo y activan ATR (Cimprich and Cortez 2008) (Fig.13). Para desempeñar sus funciones ATR coordina la parada del ciclo celular, la reparación y el comienzo de la replicación. ATR es esencial para la correcta replicación de las células, se activa durante la fases S y G2 e interviene en la regulación de los orígenes de replicación promoviendo la estabilidad y reparación de las horquillas de replicación dañadas o

bloqueadas, impidiendo la entrada de las células en una mitosis prematura (Cimprich and Cortez 2008). Al igual que ATM, ATR activa por fosforilación a una gran cantidad de sustratos que expanden rápidamente su señalización. El sustrato mejor estudiado es CHK1, que se activa mediante fosforilación en Ser317 y Ser345 en el punto de control G2-M del ciclo. Una vez fosforilada, CHK1 es liberada de la cromatina para fosforilar a dianas clave que controlan la transición del ciclo celular promoviendo su parada (Cimprich and Cortez 2008). Ante un daño persistente ATR y CHK1 inducen la actividad transcripcional de p53, activando los mecanismos de apoptosis (Fernandez-Capetillo, Chen et al. 2002, Fragkos, Jurvansuu et al. 2009).

4.1.1. Implicación de p21 en los mecanismos de respuesta a daño en el ADN.

El eje p53/p21 es esencial para la inducción del mecanismo de respuesta a daño en el ADN y para promover la apoptosis de la célula. En la respuesta a daño en el ADN, la acción de p21 sobre el ciclo celular va a depender de sus niveles. Cuando la vía de reparación del daño en el ADN se induce se incrementan los niveles de p21, lo que conduce a la parada del ciclo en G1-S o en G2-M. En este sentido, se ha reportado que tras la parada del ciclo mediada por el eje p53/p21, la progresión a la fase S se consigue mediante la degradación de p21 vía proteasoma (Gottifredi, McKinney et al. 2004, Fragkos, Jurvansuu et al. 2009). De igual manera, se ha observado que tras el daño, los fibroblastos son capaces de entrar en mitosis una vez p21 es degradado (Fernandez-Capetillo, Chen et al. 2002). Sin embargo, la degradación de p21 parece depender más de la extensión de la lesión que del tipo de daño. De este modo, si el daño no es muy elevado se produce una estabilización de p21 y la consiguiente parada del ciclo celular, mientras que si el daño es muy elevado se favorece la degradación de p21, permitiendo así la apoptosis (Perucca, Cazzalini et al. 2009). Por otro lado, en fibroblastos humanos se ha observado que la ausencia de p21 provoca un aumento en la expresión génica y en los niveles de proteínas implicadas en el mecanismo de reparación de daño en el ADN (H2AX γ , ATM, ATR, CHK1) (Perucca, Cazzalini et al. 2009).

4.1.2. Mecanismos de reparación y desarrollo tumoral.

El mecanismo de reparación del daño en el ADN limita el acumulo de mutaciones que podrían constituir el origen de un tumor. Las mutaciones en *ATM* se encuentran entre un 0,5% y 1% de la población. Estas mutaciones conducen en la mayoría de los casos a proteínas truncadas o productos proteicos inestables, lo que finalmente reduce la cantidad de ATM funcional. Las personas con mutaciones en ambos alelos del gen *ATM* sufren un desorden neurodegenerativo denominado Ataxia-Telangiectasia, caracterizado por una fuerte

inestabilidad genética como consecuencia de una respuesta defectuosa a lesiones específicas en el ADN, aumentando su predisposición al cáncer. Las mutaciones en el gen de *ATR* son menos frecuentes, y son compatibles con la vida en su forma hipomórfica o heterocigota. Las mutaciones en este gen dan lugar al síndrome de Seckel, un trastorno autosómico recesivo caracterizado por un retraso en el crecimiento y microcefalia. Aunque las mutaciones en *ATM* y *ATR* son poco frecuentes, los tumores humanos presentan habitualmente alteraciones en los elementos de reparación del daño en el ADN. De hecho, biopsias humanas de tumores en estados tempranos de conversión maligna, muestran ya el mecanismo de reparación de daño activado (Cimprich and Cortez 2008). *ATR* y *ATM* participan en los mecanismos de reparación del daño originado por oncogenes (Lopez-Contreras and Fernandez-Capetillo 2010), y se ha reportado que *ATR* se activa tras la mayoría de los tratamientos quimioterápicos contra el cáncer (Cimprich and Cortez 2008).

Los ratones deficientes en *Atm* (*Atm*^{-/-}) muestran una fuerte predisposición a desarrollar linfomas tímicos, que provocan su muerte en menos de un año (Shiloh and Kastan 2001, Shiloh 2003). Los modelos de ratón deficientes en *Atm* en combinación con otros supresores de tumores como *p53* (*Atm*^{-/-};*Trp53*^{-/-}), son más propensos al desarrollo de linfomas espontáneos o inducidos por radiación, que los animales deficientes en *Atm*^{-/-} o en *p53*^{-/-}. Además, los fibroblastos de estos animales no son capaces de detener el ciclo celular tras ser tratados con irradiación tipo γ (Bailey, Gurley et al. 2008). Se ha visto que *ATM* y *p21* cooperan en la supresión de aneuploidía y en el desarrollo tumoral. Los animales *Atm*^{-/-};*Cdkn1a*^{-/-} desarrollan sarcomas, leucemia mielode, hepatomas, teratomas y carcinomas, y los fibroblastos muestran aumento de inestabilidad cromosómica, comparado con los deficientes en *Atm* o *Cdkn1a* (Shen, Heng et al. 2005). Estas deficiencias además de incrementar la inestabilidad genómica, ocasionan envejecimiento prematuro, y muestran defectos en la proliferación de células madre (Barboza, Liu et al. 2006). Los ratones deficientes en *Atr* (*Atr*^{+/-}) o en combinación con *Atm* (*Atr*^{+/-};*Atm*^{+/-}) muestran una disminución en la supervivencia e incremento en la incidencia tumoral desarrollando tumores de diversa etiología (Brown and Baltimore 2000, Fang, Tsao et al. 2004).

La respuesta a daño en el ADN se asume como una barrera temprana anticancerosa manifestada en las fases tempranas de la tumorigénesis. En este sentido, datos procedentes de lesiones precancerosas humanas, de modelos animales nulos para *Arf*, *Atm* y *p53* y de xenotrasplantes de piel humana, han permitido establecer un modelo de desarrollo tumoral en el que la inestabilidad genómica, ocasionada por el estrés replicativo oncogénico, se

contempla como un evento temprano del desarrollo tumoral (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008). Así, en las lesiones precancerosas, la estimulación aberrante de la proliferación mediada por oncogenes, conduce a un estrés replicativo y a una inestabilidad genómica que genera una presión selectiva a favor de la generación de mutaciones en p53. Ante esta situación, las vías de respuesta a daño en el ADN conducen a una parada de ciclo celular, para reparar la lesión, o bien dirigen a la célula a apoptosis o senescencia (Bartkova, Horejsi et al. 2005). Si la célula sobrevive, o el mecanismo de reparación es defectuoso, se produce una acumulación de mutaciones adicionales, el proceso canceroso avanza dando lugar finalmente a un tumor maligno y metástasis (Fig.14).

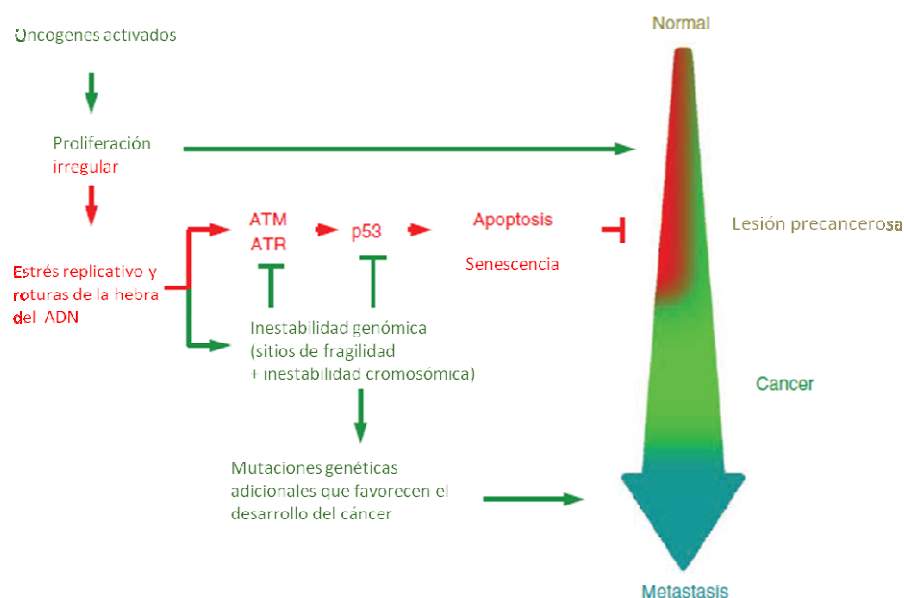


Figura 14.- Modelo de daño en el ADN inducido por oncogenes para el desarrollo y progresión de cáncer. La inestabilidad genómica y la supresión tumoral (apoptosis y senescencia) están presentes desde el comienzo en el desarrollo del cáncer, antes de la transición de lesiones precancerosas a tumores malignos, y son el resultado directo del estrés replicativo inducido por oncogenes. (Modificada de Halazonetis, Gorgoulis et al., 2008).

4.2. Mecanismos de eliminación de las células dañadas.

Cuando la célula no puede reparar el daño, inicia el programa de muerte celular para su eliminación definitiva. Dentro de los tipos de muerte celular, la apoptosis es el mecanismo más estudiado, pero existen otras formas de eliminación de células dañadas: muerte celular mitótica, autofagia o necrosis. En un mismo tejido, pueden producirse más de un tipo de muerte celular al mismo tiempo.

La apoptosis es un proceso fuertemente regulado con funciones cruciales en el mantenimiento de la homeostasis y el desarrollo tisular, y está directamente implicado con los

procesos de desarrollo tumoral (Ryter, Mizumura et al. 2014). Como características morfológicas, la apoptosis se distingue por la formación de vesículas en la membrana plasmática, contracción de las células, condensación de la cromatina y fragmentación internucleosomal del ADN. La apoptosis se puede desencadenar principalmente a través de dos rutas moleculares: la vía extrínseca (mediante receptores de muerte) y la vía intrínseca (a partir de la mitocondria) (Ashkenazi and Dixit 1998, Shi 2002, Ryter, Mizumura et al. 2014). La vía extrínseca se activa mediante la unión de ligandos a los receptores de muerte celular de membrana (Fas, TNFR o TRAIL) lo que inicia una cascada de señalización mediada por caspasas con activación en último término de caspasas efectoras (3, 6 y 7) (Ashkenazi and Dixit 1998). Por lo general, la activación de caspasa 3 se usa como marcador de la inducción de apoptosis. Por otra parte, la vía intrínseca está mediada principalmente por eventos moleculares que ocurren en la mitocondria (Ryter, Mizumura et al. 2014), como consecuencia de la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, por acción de proteínas de la familia de BCL-2, o por la liberación de citocromo c que induce apoptosis a través de la activación de caspasa 9 con la consiguiente activación de procaspasas y las caspasas efectoras (Ashkenazi and Dixit 1998, Shi 2002, Ryter, Mizumura et al. 2014). La activación de mecanismos encaminados a inhibir la apoptosis o la inactivación de mecanismos que la promueven, es muy frecuente en el proceso de malignización tumoral, y determinan la resistencia de muchos tumores a determinadas terapias antitumorales (Hunter, LaCasse et al. 2007, Sparano, Moulder et al. 2009).

La muerte celular mitótica es una forma muy común de muerte en tumores. Se ha descrito por su morfología que las células que sufren muerte celular mitótica muestran aberraciones nucleares, multi o micronucleos, y se han comenzado a identificar los mecanismos celulares y moleculares que tienen lugar en ella. La muerte celular mitótica ocurre principalmente de dos maneras: directamente durante el proceso de mitosis por fragmentación cromosómica, o mediante una mitosis fallida denominada catástrofe mitótica. Cada uno de estos tipos de muerte celular mitótica se manifiesta típicamente como una parada prolongada de la mitosis (Stevens, Abdallah et al. 2013).

La catástrofe mitótica es un modo de muerte celular resultado de una prematura o inapropiada entrada de las células en la mitosis, y puede estar causada por estrés físico o químico, agentes que influyen en la estabilidad de los microtúbulos, varias drogas antitumorales o fallo de la mitosis causada por defectos en los puntos de control de la célula. Puede coexistir con otros modos de muerte, apoptosis o necrosis, y su resultado final depende

del perfil molecular de la célula. La catástrofe mitótica se caracteriza por la formación de envolturas nucleares alrededor de grupos de cromosomas individuales sin segregar, y se relaciona con una incompleta síntesis del ADN y una condensación prematura de los cromosomas. Una de las características de este tipo de muerte celular es la generación de células gigantes multinucleadas que pueden ser viables temporalmente (Vakifahmetoglu, Olsson et al. 2008). Es importante saber que las células sensibles a la apoptosis muestran muy pocas o ninguna posibilidad de tener características de catástrofe mitótica.

5.- Carcinomas Escamosos de Cabeza y Cuello.

5.1 Características.

El Carcinoma Escamoso de Cabeza y Cuello (CECyC) comprende múltiples tumores de procedencia epitelial que surgen en zonas como la cavidad oral, faringe, laringe y cavidad nasal. Constituyen el sexto tipo de cáncer humano más frecuente a nivel mundial (séptimo en España), con medio millón de casos nuevos anuales (GLOBOCAN 2012). A pesar de los avances recientes en cuanto al tratamiento con cirugía, radiación y quimioterapia, la morbilidad y mortalidad derivadas de la enfermedad y su tratamiento son elevadas y la tasa de supervivencia global de los pacientes con CECyC a cinco años sigue siendo baja, alrededor del 50% (Sun, Zhang et al. 2012). Por tanto, el desarrollo de modelos animales que recapitulen las características del CECyC humano permitiría avanzar en el descubrimiento de nuevas dianas moleculares susceptibles de intervención terapéutica (Chin, Boyle et al. 2006, Leeman, Lui et al. 2006, Moral and Paramio 2008). Los principales factores de riesgo relacionados con el desarrollo de esta patología son el alcohol y/o el tabaco, cuyo efecto conjunto incrementan el riesgo en 100 veces (Neville and Day 2002). Otro factor de riesgo es la infección por VPH, detectado en alrededor del 20% de todos los tumores, elevándose al 50% en el caso de los tumores orofaríngeos (Leemans, Braakhuis et al. 2011). Además, existen factores genéticos de riesgo como la anemia de Fanconi que predispone al desarrollo de CECyC (Lin and Kutler 2013).

5.2 Alteraciones moleculares y modelos animales de CECyC.

La exposición a los factores de riesgo citados anteriormente puede originar mutaciones y alteraciones en vías de señalización que en último término pueden dar lugar a la aparición de un tumor. Entre las alteraciones moleculares más directamente implicadas en el desarrollo de los CECyC destacan las mutaciones en p53, las alteraciones en la vía PI3K/AKT/mTOR (Tsui, Poh et al. 2009) y el aumento de expresión del EGFR (Grandis and Tweardy 1993, Hama, Yuza et al.

2009). Se ha detectado una señalización persistente en la actividad del eje Akt/mTOR, derivada de la expresión y actividad del EGFR, y se ha encontrado que entre el 50-70% de los pacientes con CECyC presentan mutaciones en p53 (Graveland, Golusinski et al. 2011), siendo estas mutaciones parcialmente responsables de la resistencia a radioterapia (Skinner, Sandulache et al. 2012).

La vía PI3K/Akt/mTOR controla importantes procesos celulares como la proliferación, el metabolismo, la apoptosis y la angiogénesis, regulando el crecimiento y la supervivencia celular (Polivka and Janku 2014). Se ha detectado amplificación y/o mutación del gen PI3KCA (subunidad catalítica α de la PI3K) en un 40% de los CECyC humanos y un incremento de la actividad de Akt entre el 20-60% de los tumores orales (Moral and Paramio 2008). Como consecuencia de la activación de la PI3K se produce un cambio conformacional en la membrana que posibilita el reclutamiento de Akt y su posterior activación por fosforilación en los residuos Ser473 y Thre308 (Di Maira, Salvi et al. 2005). Una vez activada Akt, fosforila diversos sustratos celulares implicados en supervivencia, crecimiento, proliferación, inhibición de la apoptosis y síntesis de proteínas. Una de las dianas de Akt es la quinasa mTORC1, implicada directamente en la activación de la síntesis proteica a través de la activación por fosforilación de 4E-BP1, P70-S6K y la de la quinasa ribosomal S6 (Slomovitz and Coleman 2012), también puede inhibir la activación de PI3K mediante un mecanismo de retroalimentación de la vía (McC Campbell, Broaddus et al. 2010). Se ha reportado que la actividad de mTOR es un evento temprano en los CECyC relacionado con la metástasis en nódulos linfáticos (Di Maira, Salvi et al. 2005, Molinolo, Hewitt et al. 2007, Patel, Marsh et al. 2011, Sun, Zhang et al. 2012). El aumento en la expresión de EGFR posibilita la activación de múltiples vías relacionadas con el desarrollo tumoral activando la vía MAPK y PI3K-Akt-mTOR (Ozanne, Richards et al. 1986, Grandis and Tweardy 1993, Hama, Yuza et al. 2009). Cuando EGFR une sus ligandos, el receptor provoca la activación de señales a través de los ejes Ras/MAPK, PI3K/Akt, así como la activación de la transcripción génica dependiente de STAT3 (Kijima, Niwa et al. 2002, Leeman, Lui et al. 2006, Squarize, Castilho et al. 2006, Uribe and Gonzalez 2011, Sun, Zhang et al. 2012). Por otra parte los ejes, pRB/ciclina D1, TGF β /Smads y NF κ B, se han encontrado alterados también en los CECyC (Squarize, Castilho et al. 2006, Ferris and Grandis 2007, Smeets, van der Plas et al. 2011, Sun, Zhang et al. 2012).

La generación de modelos animales que recapitulen esta patología resulta fundamental a la hora de establecer las alteraciones clave en el desarrollo de estos tumores, resultando útiles como herramientas para el testado preclínico de compuestos con capacidad

antitumoral. Hasta el momento existen pocos modelos animales útiles en el estudio de los CECyC. Así, se ha generado un modelo de displasia en lengua y esófago a través de la un ratón con expresión aumentada de la ciclina D1 en el epitelio orofaríngeo (Nakagawa, Wang et al. 1997). Estos animales desarrollaban tumores invasivos con la sucesiva pérdida de p53 (Opitz, Harada et al. 2002). De igual forma, ratones que portan el oncogén *KrasG12D* activado, desarrollan tumores benignos, pero es necesaria la mutación de p53 para que progresen a CCEs (Caulin, Nguyen et al. 2007). La expresión de una forma inducible de este oncogén en la capa basal de los epitelios estratificados da lugar a la aparición de CCEs en la mucosa oral (Vitale-Cross, Amornphimoltham et al. 2004). De forma análoga, la eliminación condicional de *Pten* y *Tgfbr1* conduce al desarrollo de CECyC que muestran la activación del eje EGFR/PI3K/Akt/mTOR/survivina, de IKK β /NF κ B, de Stat3, y a un aumento en la expresión de ciclina D1 y del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) (Sun, Zhang et al. 2012). En nuestro laboratorio se han desarrollado varios modelos animales de tumores orales. El modelo *BK5myrAkt* (en adelante myrAkt) expresa una forma permanentemente activa de la quinasa Akt1 en la capa proliferativa de los epitelios estratificados (Segrelles, Lu et al. 2007). Estos animales desarrollaron lesiones orales benignas, que rara vez progresan a carcinomas agresivos como consecuencia de un proceso de senescencia prematura mediada por p53 (Moral, Segrelles et al. 2009). En base a esto, se generó un ratón myrAkt nulo para p53 en la capa proliferativa de los epitelios estratificados, mediante la tecnología Cre-LoxP (myrAkt;Trp53 ^{Δ Epi}). En estos animales, las lesiones orales (labio, epitelio oral, lengua y paladar) progresaron con alta frecuencia a carcinomas agresivos, debido a que en las células con actividad Akt incrementada no se activan los mecanismos de senescencia como consecuencia de la pérdida de p53. Estos tumores muestran un aumento en la tasa de proliferación y en la angiogénesis, así como alteraciones moleculares similares a las encontradas en CECyC humanos, como activación de las vías de NF κ B, Stat 3 y varios inductores de la progresión del ciclo celular como ciclina D1, c-myc o β -catenina (Moral, Segrelles et al. 2009). Las alteraciones observadas son frecuentes en tumores orales humanos (Leemans, Braakhuis et al. 2011), lo que apoya la utilización de este modelo en estudios preclínicos.

5.3. Implicación de pRb y p21.

Se ha detectado que el eje p16/ciclina D/CDK4/pRb se encuentra inactivado en la mayoría de los CECyC. En el 80% de los casos, esta inactivación se atribuye a una mutación/metilación, en combinación con la pérdida en homocigosis del gen *CDKN2A*, que codifica para la proteína p16 (y p14), y la amplificación del locus de ciclina D1. Además, tras la infección por VPH (serotipos 16 y 18), la expresión de las oncoproteínas E7 y E6 produce la degradación de pRb y p53 (Aguilar-Lemarroy, Gariglio et al. 2002, Leemans, Braakhuis et al. 2011, Smeets, van der Plas et al. 2011).

En relación a la implicación de la familia de pRb en el desarrollo de esta patología, resultados de nuestro grupo, mostraron que la pérdida simultánea de p107 y pRb da lugar a la aparición de CCEs con una incidencia relevante en labio, paladar y epitelio oral. Estas alteraciones mejoraban sustancialmente mediante el tratamiento con rapamicina que conduce a la inhibición de la vía de mTOR (Costa, Santos et al. 2012).

La implicación de p21 en el desarrollo de esta patología está insuficientemente datada y por el momento la relación entre alteraciones en p21 y el desarrollo de los CECyC no es clara. La expresión de p21 en CECyC varía dependiendo de los estudios reportados, y no se ha podido establecer una correlación clara entre sus niveles de expresión y el desarrollo de estos tumores. Además, aunque la expresión de p21 está controlada de forma dependiente de p53, la co-expresión de ambos en CECyC no está intrínsecamente relacionada. Se ha observado que la presencia de oncoproteínas virales de VPH incrementa los niveles de p21, pero este incremento no se ha podido correlacionar con la con mejor prognosis que presentan estos tumores (Agarwal, Mathur et al. 1998). De hecho, y aunque existe una gran variabilidad en los resultados, algunos estudios asocian el incremento de la expresión de p21 con una disminución de la supervivencia global, y una correlación inversa al tamaño del tumor (Perez-Sayans, Suarez-Penaranda et al. 2013).

En la actualidad el tratamiento para los tumores orales consiste en radioterapia combinada con cirugía. En algunos casos se incluye también la quimioterapia basada en cisplatino y en combinación con radioterapia. Sin embargo, la efectividad de la cirugía es limitada como consecuencia del elevado riesgo de aparición de recurrencias locales, de tumores secundarios, y al desarrollo de metástasis locoregionales y, en menor medida, distales (Tabor, Brakenhoff et al. 2001).

En este momento se están evaluando las terapias dirigidas contra dianas específicas de las vías EGRFR/PI3K/Akt/mTOR (Freudlsperger, Burnett et al. 2011). Así el anticuerpo monoclonal contra EGFR, *cetuximab*, en combinación con quimioterapia y radioterapia (Specenier and Vermorken 2013), y varios inhibidores específicos de distintos miembros de la vía, como PI3K (Garlich, De et al. 2008), Akt y mTOR (Amornphimoltham, Sriuranpong et al. 2004), se encuentran en uso clínico. Actualmente, se está trabajando en una segunda generación de inhibidores de mTORC1 y mTORC2, capaces de bloquear la retroalimentación de la vía y la consiguiente activación de Akt (Fiedler, Giaccone et al. 2011), así como la inhibición combinada de diversos receptores con actividad tirosinquinasa. En este sentido, la posibilidad de disponer de modelos animales que recapitulen todos o la mayor parte de los procesos moleculares que tienen lugar en los CECyC o en algunos de sus subtipos, resulta esencial para probar la actividad, especificidad y efectividad de fármacos diseñados contra dianas moleculares implicadas en el desarrollo de estos tumores.

OBJETIVOS

Estudios previos procedentes de animales modificados genéticamente y de tumores humanos, han demostrado la importancia de pRb y p53 en la homeostasis epidérmica y en el desarrollo de tumores epiteliales. Dado que p21 es una diana transcripcional de p53 que está implicada en el mantenimiento homeostático y el desarrollo tumoral epitelial, y que se ha reportado que en fibroblastos actúa frenando el avance del ciclo celular en ausencia de pRb, el objetivo global de este trabajo consiste en **determinar la posible cooperación funcional, *in vivo*, entre pRb y p21 en epitelios estratificados**, centrándonos en los procesos de proliferación, diferenciación y desarrollo tumoral epitelial.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

1. Analizar los efectos de la eliminación de pRb y p21 en la epidermis de ratón a través de un modelo múrido deficiente en p21 y deficiente en Retinoblastoma en la epidermis ($pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$), mediante:
 - 1.1. Caracterización del fenotipo epidérmico
 - 1.2. Efectos sobre la homeostasis epidérmica
2. Analizar el posible papel de p21 como supresor tumoral epitelial en ausencia de pRb mediante:
 - 2.1. Caracterización del desarrollo tumoral en el modelo múrido $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$
 - 2.2. Determinación de los mecanismos moleculares responsables de la susceptibilidad al desarrollo tumoral
3. Dada la frecuencia elevada de lesiones tumorales orales observadas en el ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, nos proponemos validar los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ como posible modelo para el estudio de tumores orales.

MATERIALES Y MÉTODOS.

1.- Modelos animales de experimentación.

Durante el periodo experimental se utilizaron animales modificados genéticamente generados en un fondo genético enriquecido en FVB. Los genotipos empleados se describen a continuación:

$Rb^{F19/F19}$ (Rb F/F): animales que portan secuencias intrónicas *loxP* flanqueando el exón 19 del gen *Rb1*. Estos ratones no presentan ninguna anomalía y se han utilizado como **control** (Ruiz, Santos et al. 2004).

$Rb^{F19/F19};K14Cre$ ($Rb^{\Delta Epi}$): animales que portan la delección específica del exón 19 del gen *Rb1* en la capa basal de los epitelios estratificados. Esto se consigue mediante el cruce de ratones **Rb F/F** con ratones que expresan la recombinasa *Cre* bajo el control del promotor de la queratina k14 (**K14Cre**), que dirige su expresión a la capa basal de los epitelios estratificados (Ruiz, Santos et al. 2004).

$Cdkn1a^{-/-}$ ($p21^{-/-}$): animales portadores de la delección del exón 2 del gen *Cdkn1a* que ocupa el 90% de la secuencia codificadora e implica la pérdida de la proteína en todos los tejidos del animal (Deng, Zhang et al. 1995).

Estos tres modelos animales fueron cedidos por el Dr. Anton Berns (*Nederlands Kanker Institute*, Holanda).

$Rb^{F19/F19};Cdkn1a^{-/-}$ (Rb F/F; $p21^{-/-}$): animales portadores de secuencias intrónicas *loxP* flanqueando el exón 19 del gen *Rb1* y de la delección del gen *Cdkn1a* en todos los tejidos del animal. Estos animales se obtuvieron a partir del cruce de ratones Rb F/F y $p21^{-/-}$.

$Rb^{\Delta Epi};Cdkn1a^{-/-}$ ($Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$): animales objeto principal del estudio. Este modelo porta la delección específica del gen *Rb1* en la capa basal de los epitelios estratificados y del gen *Cdkn1a* en todos los tejidos del animal. Se obtuvo mediante el cruce de animales Rb F/F; $p21^{-/-}$ con animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{+/-}$, dando lugar a las diferentes combinaciones alélicas necesarias para el mantenimiento de la línea y su estudio.

En la siguiente tabla resumen se recogen las diferentes líneas animales obtenidas, los cruces de origen y la nomenclatura utilizada:

Cruces		Línea animal	Nomenclatura
Rb^{F19/F19}	<i>K14Cre</i>	<i>Rb^{F19/F19};K14Cre</i>	Rb^{ΔEpi}
Rb^{F19/F19}	<i>Cdkn1a</i> ^{-/-}	<i>Rb^{F19/F19};Cdkn1a</i> ^{-/-}	p21 ^{-/-}
Rb^{F19/F19};Cdkn1a^{-/-}	<i>Rb^{F19/F19};K14Cre;Cdkn1a</i> ^{+/-}	<i>Rb^{F19/F19};K14Cre;Cdkn1a</i> ^{+/-}	Rb ^{ΔEpi} ;p21 ^{+/-}
		<i>Rb^{F19/F19};K14Cre;Cdkn1a</i> ^{-/-}	Rb^{ΔEpi};p21 ^{-/-}

Todos los animales se mantuvieron durante un periodo máximo de 12 meses en un animalario con ciclos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, temperatura de 20 ± 2°C, 55 ± 10% de humedad relativa y alimentados *ad libitum* con pienso estándar y agua. Los animales de interés experimental fueron sacrificados en atmósfera de CO₂ cuando eran requeridos para los experimentos o manifestaban signos de deterioro.

La manipulación animal se realizó cumpliendo con los criterios establecidos por el Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEA) del CIEMAT y la Federación de Asociaciones Europeas de las Ciencias del Animal de Laboratorio (FELASA).

2.- Genotipado de los animales.

El genotipado de los animales se realizó por PCR según el protocolo descrito previamente (Brugarolas, Chandrasekaran et al. 1995, Ruiz, Santos et al. 2004). Para las reacciones de PCR se utilizó 1μL del ADN genómico. El aislamiento del ADN se efectuó a partir de biopsias del extremo final de la cola de animales de 10 días postparto (P10), o de P2-P3 en el caso del aislamiento de queratinocitos primarios. El protocolo a seguir fue el descrito por Peter W. Laird (Laird, Zijderveld et al. 1991): digestión del tejido en 700μL de un tampón de lisis (100mM Tris-HCl pH 8,5, 5mM EDTA, 0,2% SDS, 200mM NaCl y 100μg proteinasa K/mL) en agitación a 55°C durante toda la noche, y posterior precipitación del ADN con isopropanol (en proporción 1:1). Una vez precipitado, el ADN se lavó con 70% etanol para eliminar las sales residuales, y se resuspendió en 500μL de tampón TE (10mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, pH 8,0).

La reacción de PCR preparada por muestra se describe a continuación:

<i>Componente</i>	<i>Volumen</i>
ADN	1 µL
Go Taq Hot Start Green master Mix 2X:	5 µL
Polimerasa <i>Go Taq Hot Start</i>	
Tampón de reacción <i>Green Go Taq</i> (pH 8.5) 2X	
400 µM dATP	
400 µM dGTP	
400 µM dCTP	
400 µM dTTP	
4mM MgCl ₂	
Oligonucleótidos específicos (10 µM)	0,5 µL
Agua libre de nucleasa	Hasta 10 µL finales

El programa de PCR que se utilizó presentó los siguientes parámetros:

- 5 min 94°C
- 30 segundos 94°C
- 30 segundos 58°C
- 50 segundos 72°C
- 10 min 72°C

Los oligonucleótidos específicos empleados para el genotipado de los diferentes animales se describen a continuación:

Gen	Oligonucleótidos (5'-3')	Secuencia	Fragmento amplificado (oligonucleótidos utilizados)	Tamaño de la banda
<i>Rb</i>	Rb 18	GGCGTGTGCCATCAATG	<i>Alelo Rb^{wt}</i> (Rb18 + Rb19)	680pb
	Rb19	AACTCAAGGGAGACCTG	<i>Alelo Rb^{Floxedo}</i> (Rb18+Rb19)	748pb
			<i>Alelo Rb^{Δ19}</i> (Rb18 + Rb19)	300pb
<i>Cre</i>	Cre 1	CGATGCAACGAGTGATGAGGTTT	<i>Alelo Cre</i> (Cre1 + Cre2)	400pb
	Cre 2	GCACGTTACCGGCATCAAC		
<i>Cdkn1a</i>	PZ1E3R(P21-1)	CAATCTGCGCTTGAGTGATAG	<i>Alelo^{wt}</i> (P21E2F+PZ1E3R)	700pb
	GGP21E2F(P21-2)	GACAAGAGGCCAGTACTTCCTC	<i>Alelo^{ko}</i> (PGK1-F+Z1E3R)	250pb
	GGPGK1-F(P21-3)	GCAGCCTCTGTTCCACATACAC		

Los productos de la PCR se resolvieron por electroforesis en un gel de 1,8 % de agarosa en TBE (89mM Tris-borato, 2mM EDTA, pH 8,0) y 1µg/mL de Bromuro de Etidio (*Sigma*), a 90 V durante 30 min. En un pocillo anexo se incluyó un marcador de bajo peso molecular (marcador IX, *Roche*). La visualización de los fragmentos de ADN se hizo con un transiluminador de luz ultravioleta y el programa *Quantity One* (*BioRad laboratories*), determinando la existencia de los fragmentos esperados.

3.- Monitorización tumoral.

Los animales estudiados fueron monitorizados durante 12 meses y se sacrificaron cuando mostraron signos de deterioro, heridas y/o zonas tumorales. Las necropsias se realizaron en animales con edades comprendidas entre 1 y 12 meses detallando la edad, tipo de lesión encontrada y localización. La cinética de aparición tumoral se analizó estadísticamente utilizando la curva de *Kaplan Meier*, el test de *Log-Rank* y el editor de datos SPSS para *Windows 11.5.1*.

4.-Toma de muestras y procedimientos histológicos.

Una hora previa al sacrificio, todos los animales fueron inyectados intraperitonealmente con bromodeoxiuridina (BrdU) para evaluar la tasa de proliferación (Ver apartado nº 11 *Medida de la proliferación celular*). Durante las necropsias, la recogida de muestras se realizó en distintos medios de conservación en función del tipo de procesamiento y posterior análisis experimental, según se detalla a continuación.

Las muestras destinadas al análisis histopatológico se fijaron en 4% de formaldehído en PBS (137mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM Na₂H₂PO₄; pH 7,2) o en 70% de etanol, y se embebieron en parafina. Se realizaron cortes histológicos de 5µm de espesor utilizando un micrótopo (*Leica*). Tras retirar la parafina, se tiñeron con hematoxilina y eosina (H&E) para su evaluación patológica o se procesaron para inmunohistoquímica o inmunofluorescencia.

Las muestras destinadas a la extracción y análisis de ARN se conservaron en *RNA later* (*Ambion*) a -80°C. El *RNA later* es un reactivo acuoso que embebe rápidamente los tejidos impidiendo la degradación del ARN por ribonucleasas, permitiendo la manipulación de la muestra biológica a temperatura ambiente. Las biopsias destinadas a análisis bioquímicos se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

5.-Trasplantes de piel.

Los trasplantes se realizaron a partir de biopsias de piel de lomo (1-2 cm²) de ratones de los cuatro genotipos estudiados a 17,5-18,5 dpc (días *postcoitum*) o días de gestación (Martínez-Cruz, Costa et al. 2010). La piel del donante se trasplantó sobre una zona de tamaño similar al animal receptor, al que previamente se le había eliminado piel del lomo mediante

cirugía. Como animales receptores se emplearon siempre hembras inmunodeficientes NOD/SCID de 2 meses de edad para evitar el rechazo. La piel donante se cosió a los bordes de la piel receptora con sutura de seda y se cubrió con *NewSkin* (Medtech, Jackson) como medio de protección. La evolución del trasplante se observó diariamente y los animales se sacrificaron a los 3 meses post-trasplante, procesando la región trasplantada y las zonas adyacentes para su posterior análisis.

6.- Análisis inmunohistoquímico.

Las secciones de tejido teñidas con H&E permitieron seleccionar las muestras de tejido adecuadas para su posterior análisis. El análisis inmunohistoquímico se realizó sobre muestras fijadas en 4% de formaldehído en PBS o 70% de etanol. Después del desparafinado, las muestras fijadas en formaldehído se trataron con citrato sódico (10mM; pH 6,0) para desenmascarar los epítomos, y con 3% de H₂O₂ durante 10 min para el bloqueo de la peroxidasa endógena. Posteriormente, las muestras se incubaron con 5% de suero fetal de caballo en PBS para bloquear las uniones inespecíficas. La incubación de los anticuerpos primarios se hizo a 4°C durante toda la noche, mientras que los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Todos los anticuerpos se administraron disueltos en 1% de albúmina bovina sérica (BSA) en PBS. Después de cada tratamiento e incubación se hicieron al menos 3 lavados con PBS. La detección del anticuerpo se realizó mediante el sistema avidina/estreptavidina-peroxidasa (*ABC kit, Vectastain*). La reacción se visualizó añadiendo diaminobencidina como sustrato cromógeno y H₂O₂ (*Peroxidase Substrate Kit DAB, Vector Laboratories*). Las muestras se contratiñeron con hematoxilina y se cubrieron con un portaobjetos utilizando un montador automático (*Leica CV5030*).

Las inmunofluorescencias de muestras fijadas en formol se sometieron a un tratamiento previo al bloqueo, con 100mM NH₄Cl durante 30 min a temperatura ambiente para evitar la autofluorescencia debida a los restos de formalina. El montaje se realizó con moviol (*Hoechst*) al que se le añadió DAPI (200 µg/ml) para la detección de los núcleos celulares. La visualización se realizó en un microscopio equipado con una fuente de epifluorescencia y filtros adecuados (*Zeiss Axioplan2 imaging*). Las imágenes se capturaron con una cámara digital (*AxioCam MRm*) y se visualizaron con el programa *AxioVision Rel.4.6*. El procesamiento de las imágenes se realizó mediante los programas *CorelDRAW 11* y *Corel Photo-Paint 11*.

Los anticuerpos primarios y secundarios y las diluciones empleadas, se describen a continuación:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
ESPECIFICIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
K5	Policlonal de conejo	Covance	1/50
K6	Policlonal de conejo	Covance	1/500
K10	Monoclonal de ratón	Dakocytomation	1/50
K13	Monoclonal de ratón	Abcam	1/250
H2AXgamma-Ser139	Monoclonal de ratón	Upstate	1/50
γδ T-Cell Receptor-FITC	Hamster	BD Pharmingen	1/50
CD45-biotinilado	Monoclonal de rata	Pharmingen	1/50
F480-biotinilado	Monoclonal de rata	Abcam	1/50
CD3-ε	Policlonal de conejo	Dakocytomation	1/6
p53	Policlonal de conejo	Novocastra	1/500
BrdU	Monoclonal de ratón	Roche	1/50
BrdU	Monoclonal de rata	Abcam	1/50
Caspasa 3 activa-Asp175	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/50
Akt IHC Specific-P^{Ser473}	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/50
S6-^{PSer 235/236}	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/100
p65-P^{Ser536}	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/50
Stat3	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/500
K15	Monoclonal de ratón	Neomarkers	1/50
CD34	Monoclonal de rata	eBioscience	1/50

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ESPECIFICIDAD	CONJUGADO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Rata	<i>Texas-Red</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/500
	<i>Biotina</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/500
Conejo	<i>Biotina</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/500
	<i>Texas-Red</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/500
Ratón	<i>Biotina</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/500
	<i>FITC</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/50
	<i>Texas-Red</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/500
Avidina-D	<i>Texas-Red</i>	<i>Jackson ImmunoResearch</i>	1/500

7.- Detección de células mastocitarias.

La visualización de mastocitos se realizó mediante una tinción con azul de toluidina (colorante de tiamina). Este colorante aprovecha la metacromasia de los gránulos citoplasmáticos de estas células para su localización. Para ello, se seleccionaron cortes histológicos de piel de lomo de ratón de los cuatro genotipos en estudio fijados en formol e incluidos en parafina. Tras retirar la parafina, las muestras se sumergieron 3 min en una solución 0,1% de azul de toluidina en tampón acetato-acético (pH 4,2). Posteriormente, se

lavaron en tampón acetato-acético (pH 4,2) y se sumergieron en una solución acuosa de 4% de molibdato durante 10 min. Por último, las muestras se lavaron con agua destilada y se contratiñeron con hematoxilina para su posterior análisis. Las células mastocitarias sufren una reacción metacromática visualizándose en color violeta, mientras que el resto del tejido se mantiene en color azul.

8.- Análisis de los niveles de proteína. *Western blot*.

Los niveles de proteína de los animales se analizaron a partir de extractos de proteínas totales procedentes de piel, tumores y queratinocitos primarios mediante la técnica *western blot*. Los extractos se obtuvieron por homogeneización activa (disgregación con mortero o pipeta en caso de células) y pasiva (al menos 3 ciclos de congelación/descongelación en nitrógeno líquido/baño a 37°C). Durante el proceso las muestras se encontraban inmersas en un tampón de lisis: 200mM Hepes pH 7,9, 25% glicerol, 0,4M NaCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA y 1% Nonidet P40, o en bien se empleo el tampón de lisis RIPA (del inglés *Rad**io**immunopreci**P**itation Assay*) (20mM Tris-HCL pH 7.5, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% deoxicolato de sodio, 0.1% SDS), suplementado con inhibidores de proteasas (5µg/ml de aprotinina y leupeptina, 1mM PMSF, 2,5mM DTT) y fosfatasas (1mM Na₃VO₄, 20mM NaF y 1mM NaPPi). Los lisados se centrifugaron a 12.000rpm a 4°C durante 10 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos fríos. La concentración de proteínas se determinó mediante el análisis colorimétrico de *Bradford* (*BioRad*) usando una curva estándar de rango 1,25 µg/µl - 20 µg/µl de BSA.

Las proteínas de los extractos se separaron por electroforesis a 120V durante 1 hora en geles de poliacrilamida-SDS (4-12% Bis-Tris; *Invitrogene*). Se utilizaron 50µg de proteína por muestra. En todos los geles se incluyó un marcador de peso molecular (10kDa-250kDa; *BioRad*). Los geles se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (*Amershan Pharmacia Biotech*) mediante electroforesis en cámara semihúmeda utilizando el tampón de transferencia (33mM Tris-Base, 194mM Glicina y 20% metanol) a 90V durante 90 min a 4°C. Las membranas se incubaron con una solución de 5% BSA en TBS-Tween (20mM Tris-Cl, 137mM NaCl, pH 7,6, 0,5% Tween) durante 1 hora para bloquear las uniones inespecíficas. A continuación, se incubaron con los correspondientes anticuerpos primarios dirigidos contra las proteínas de interés diluidos en 1% BSA en TBS-Tween durante 12 horas a 4°C en agitación. Para la detección del anticuerpo primario se utilizaron anticuerpos secundarios unidos a peroxidasa, concretamente anticuerpos anti-IgG de especificidad variable (ratón, conejo o

cabra) durante 1 hora a temperatura ambiente. Entre las incubaciones se realizaron al menos 3 lavados con TBS-Tween. Para visualizar la unión de los anticuerpos se empleó un sistema de detección de luminiscencia basado en una reacción específica de la peroxidasa (*Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate*, Pierce). En el caso de utilizar una misma membrana para la detección de varias proteínas consecutivamente, los anticuerpos previamente unidos se eliminaron tratando las membranas con una solución específica (62,5mM Tris HCl pH 6,7, 2% SDS, 100mM β -mercaptoetanol) a 55°C durante 30 min en agitación.

Los anticuerpos primarios y secundarios empleados se describen a continuación:

ANTICUERPOS PRIMARIOS			
ESPECIFICIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
pRb	Policlonal de conejo	Santa Cruz (C-15)	1/1000
p107	Policlonal de conejo	Santa Cruz (C-18)	1/500
p130	Policlonal de conejo	Santa Cruz (C-20)	1/500
E2F1	Policlonal de conejo	Santa Cruz (C-20)	1/1000
p21	Policlonal de conejo	Abcam (Ab7960-1)	1/500
p53	Policlonal de conejo	Novocastra (CM5)	1/500
Stat3-P ^{Tyr705}	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/1000
Stat3	Monoclonal de conejo	Cell Signaling 79D7	1/500
p65-P ^{Ser536}	Monoclonal de conejo	Cell Signaling (93H1)	1/500
p65	Monoclonal de ratón	Santa Cruz (F-6)	1/200
ATR-AHP 384	Policlonal de conejo	Serotec	1/500
Chk1-P ^{Ser345}	Monoclonal de conejo	Cell Signaling (133D3)	1/500
I κ B- α	Policlonal de conejo	Santa Cruz (C-21)	1/200
I κ B- γ	Policlonal de conejo	Santa Cruz (FL-419)	1/200
I κ B- α	Monoclonal de ratón	Imgenex (14A231)	1/2000
I κ B- β	Monoclonal de ratón	Imgenex (10AG2)	1/1000
γ H2AX ^{Ser139}	Monoclonal de ratón	Upstate (JBW301)	1/1000
Chk1	Monoclonal de ratón	Novocastra DCS-310.1	1/1000
H2AX	Policlonal de conejo	Abcam	1/5000
Actina	Policlonal de cabra	Santa Cruz (I-19)	1/500
Akt-P ^{Ser470}	Monoclonal de conejo	Epitomics	1/1000
S6-P ^{Ser235/236}	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/1000
Erk -P ^{Thr202/Tyr204}	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/500
Erk 1/2	Policlonal de conejo	Santa Cruz	1/200
PARP	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/500
Caspasa-3 activa	Policlonal de conejo	Cell Signaling	1/500
β -catenina activa	Monoclonal de ratón	Millipore	1/500

ANTICUERPOS SECUNDARIOS			
ESPECIFICIDAD	CONJUGADO	CASA COMERCIAL	DILUCIÓN
Cabra	Peroxidasa	Santa Cruz	1/10000
Conejo	Peroxidasa	Jackson	1/5000
Ratón	Peroxidasa	Jackson	1/5000

9.- Análisis multiproteico de los niveles de citoquinas y quimioquinas.

El análisis de los niveles de citoquinas y quimioquinas liberadas al medio extracelular se realizó empleando el sistema *R&D Systems Mouse Cytokine Array Panel A; Proteome Profiler™ ARY006*. Este sistema está provisto de 4 membranas de nitrocelulosa que contienen 40 citoquinas y quimioquinas de interés, hibridadas por duplicado y con los correspondientes controles de carga.

El análisis se realizó a partir de extracto proteico total de piel de lomo de animales de 30 días de los cuatro genotipos en estudio, de animales recién nacidos $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y de los trasplantes de piel de animales recién nacidos $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ sobre ratones inmunodeficientes. Se utilizó una membrana de nitrocelulosa por muestra analizada. Cada muestra analizada contenía una mezcla de extracto proteico de piel procedente de 3 animales de un mismo genotipo. La lisis se realizó usando el tampón facilitado por la casa comercial, y la extracción según el protocolo descrito en el *apartado 8*. En el análisis se empleó 1mg total de muestra por membrana y genotipo. Siguiendo las instrucciones de la casa comercial, muestras y membranas se preincubaron por separado durante 1 hora a temperatura ambiente con las soluciones específicas proporcionadas (las muestras con un cóctel de anticuerpos biotinilados y las membranas con una solución de bloqueo para minimizar las uniones inespecíficas). Posteriormente, se agregó la mezcla muestra-anticuerpos biotinilados a las membranas, incubándose durante 16 horas a 4°C. Por último, para el revelado se aplicó Streptavidina-HRP y los reactivos de detección de quimioluminiscencia, como se describe para la técnica *western blot* (*apartado 8*). Los positivos para cada citoquina/quimioquina de la membrana se visualizan en forma de puntos. La cuantificación de la señal de luminiscencia se realizó mediante el programa *Quantity One 1-D*. La señal quimioluminiscente emitida es proporcional a la cantidad de citoquina o quimioquina ligada a la membrana.

10.- Cultivo de queratinocitos primarios.

Los queratinocitos primarios se obtuvieron a partir de la epidermis de animales recién nacidos P3-P4 de los cuatro genotipos estudiados. La separación de la epidermis de la dermis se realizó mediante tripsinización controlada de la piel con 0,25% de tripsina (*Trypsin 1-300*, ICN *Biomedicals*) en PBS durante 18 horas a 4°C (Hennings, Holbrook et al. 1980). La epidermis obtenida se disgregó y se filtró (100µm *BD Biosciences*) para aislar las células y eliminar

impurezas. Los queratinocitos aislados se cultivaron durante 15 horas en un medio con alta concentración de calcio para favorecer la adhesión (EMEM (*Biowhitaker, Inc*), 4% suero fetal tratado con resina *Chelex 100* (*BioRad Laboratories*), 0,2mM CaCl_2 y 1% de antibiótico-antimicótico, (*Gibco*). Transcurrido este tiempo, las placas se lavaron 3 veces con PBS y se añadió medio de cultivo con una concentración de calcio más baja (EMEM, 4% suero-Chelex, 0,05mM CaCl_2 , 10ng/ml EGF y 1% antibiótico-antimicótico). Este medio permite la proliferación de los queratinocitos e impide la proliferación de posibles fibroblastos contaminantes. El medio se renueva diariamente.

El tratamiento del suero fetal con resina Chelex se realizó para eliminar el calcio existente y controlar su concentración (500mL de suero con 180g de resina en agitación durante 3 horas a 4°C).

11.- Medida de la tasa de proliferación celular.

La tasa proliferativa de los queratinocitos se analizó evaluando el grado de incorporación de BrdU (*Roche*) al ADN de las células durante la fase de síntesis. Para medir la incorporación de BrdU en un tejido o lesión tumoral, los animales se inyectaron intraperitonealmente con 0,1mg por gramo de peso del animal de una solución BrdU a una concentración de 10 mg/mL de NaCl al 0,9% en H_2O estéril. Una hora después de la inyección se sacrificó el animal fijando los tejidos en 4% de formaldehído o en 70% de etanol, incluyéndolos después en parafina. Los cortes fijados en formalina una vez desparafinados fueron tratados con 2N HCl durante 1 hora a temperatura ambiente para favorecer la desnaturalización del ADN y detectar la incorporación de BrdU.

Para medir el grado de proliferación en un cultivo celular, los queratinocitos primarios se incubaron en 10 μM BrdU diluido en el medio de cultivo a 37°C durante 1 hora. Tras la incubación, los queratinocitos se fijaron en 4% paraformaldehído durante 15 min a temperatura ambiente. Se realizaron tres experimentos independientes y se contaron como mínimo 1000 células en cada marcaje de incorporación de BrdU. El procesamiento inmunohistoquímico posterior y el anticuerpo utilizado se describen en el *apartado 6*.

12.- Diferenciación de queratinocitos primarios in vitro.

Los cultivos de queratinocitos primarios aislados de los cuatro genotipos se mantuvieron en cultivo con medio de baja concentración de calcio durante dos días. Posteriormente, se sometieron a diferenciación añadiéndoles medio de alto calcio (Hennings,

Holbrook et al. 1980, Stanley and Yuspa 1983, Yuspa, Kilkenny et al. 1989). El proceso de diferenciación se mantuvo entre 24 y 72 horas, tras las cuales se re-estimularon los cultivos con medio de bajo calcio durante 24 horas. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

13.- Transfección de queratinocitos primarios.

Cuando los cultivos primarios de queratinocitos alcanzaron el 40% de confluencia celular en placas p35 (10cm²), se transfectaron con el reactivo *Superfect* (Quiagen). Para ello, se diluyó 2,5µg de la mezcla de plásmidos y 2µl del reactivo *Superfect* en 400µl de medio EMEM sin suero. Tras 15 min de incubación a temperatura ambiente, se añadieron 600µl de medio de bajo calcio y la mezcla se añadió a los cultivos previamente lavados con PBS. 2 horas después se lavaron nuevamente con PBS y se repuso el medio de crecimiento fresco. Mediante el uso de transfecciones control se determinó que 24 horas después de la transfección, alrededor del 15% de los queratinocitos expresaban el transgén transfectado (visualizado por tinción LacZ).

14.- Ensayos de actividad Luciferasa.

La medida del grado de activación diferencial de promotores o elementos de respuesta a determinados factores de transcripción, se realizó mediante ensayos de actividad luciferasa. Los cultivos de queratinocitos primarios de los cuatro genotipos se transfectaron con los plásmidos necesarios según el protocolo del *kit Dual-Luciferase* (Promega): 1) Plásmido informador, portador de la secuencia promotora de estudio asociada al ADNc de la enzima luciferasa aislada de la luciérnaga (*Photinus pyralis*). En concreto: pGL3-E2F (plásmido de respuesta a factores de transcripción E2F; cedido por la Dra. X Lu, Ludwig Institute de Londres. 2) Plásmido de expresión del segundo tipo de luciferasa (aislado de *Renilla reniformis*) necesario para la estandarización de las diferentes muestras, evitando posibles diferencias debidas a la eficacia de la transfección. Tras 24-48 horas después de la transfección, las células se lisaron y se realizó el ensayo de actividad luciferasa según el protocolo del *kit* midiéndose la actividad en el luminómetro (*Berthold*). Se realizaron al menos dos experimentos independientes, en los que las transfecciones se hicieron por triplicado.

15.- Detección de poblaciones celulares por citometría de flujo.

La identificación de distintas poblaciones celulares se realizó mediante marcaje con anticuerpos específicos por citometría de flujo como se describe a continuación.

15.1. Análisis de la población de células madre epidérmica.

El estudio de las células madre epidérmicas se llevó a cabo en animales de 4 y 6 meses de edad de los genotipos control, p21^{-/-} y Rb^{ΔEpi};p21^{-/-}. La epidermis de los animales se aisló por tripsinización (ver *apartado 10*). Los queratinocitos obtenidos se resuspendieron en PBS, 10mM EDTA, 5μg/mL DNAasa I, durante 30 min a temperatura ambiente con agitación suave. La suspensión celular se hizo pasar por un tamiz de 40 μm para eliminar impurezas y se centrifugó a 1.400rpm durante 10 min. Tras la centrifugación, las células se resuspendieron en un tampón FACS (4% de suero fetal bovino, 0,09% azida sódica en PBS). Los queratinocitos una vez aislados y contabilizados (mediante la cámara de *Neubauer*), se incubaron con anticuerpos específicos de células madre. Las incubaciones se realizaron en 100μL de tampón FACS durante 20 min a 4°C. La concentración de anticuerpo utilizada fue de 1μg por millón de células. Los anticuerpos primarios utilizados en este caso fueron CD34 (RAM34; *eBioscience*) e integrina α6-FITC (ItgA6-FITC) (BD Pharmingen). El anticuerpo secundario utilizado para la detección de células CD34 fue anti-rat-PE (*Jackson ImmunoResearch*). Una vez marcadas las células se procedió a su detección por citometría utilizando un analizador celular (*Becton Dickinson LSR Fortessa*) y un soporte informático (*BD FACSDiva*). Los datos se analizaron mediante el software *FlowJo* (*Tree Star, Ashland, OR*).

15.2. Análisis de las poblaciones celulares inmunes de carácter inmunosupresor.

Se caracterizó el inmunofenotipo de las poblaciones celulares inmunes encontradas en el suero sanguíneo y los nódulos linfáticos de los ratones control y Rb^{ΔEpi};p21^{-/-}. Para ello, se aislaron muestras de sangre periférica en 0,5M EDTA y se lisaron las células pertenecientes a la fracción roja de la sangre utilizando un tampón de lisis (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃ y 0,5mM de EDTA). En paralelo, se obtuvo una suspensión celular procedente de los nódulos linfáticos submaxilares disgregados mediante un émbolo sobre un filtro celular de nailon de 100μm (*BD Bioscience*). Sobre la suspensión celular se emplearon los anticuerpos enumerados en la siguiente tabla, a 1μl por millón de células, con el objetivo de determinar y cuantificar la presencia de ciertos tipos celulares inmunes de interés:

ESPECIFICIDAD	ORIGEN	CASA COMERCIAL	CONCENTRACIÓN
Gr-1 FITC (RB6-8C5)	Mouse	BD Pharmingen	0,5mg/ml
CD11b-PE (M1/70)	Mouse	BD Pharmingen	0,2mg/
CD11b-FITC (M1/70)	Mouse	eBioscience	0,5mg/ml
CD49d (9C10-MFR4.B)	Mouse	BD Pharmingen	0,2mg/ml

15.3. Análisis del perfil de ciclo celular.

El análisis se llevó a cabo mediante el marcaje con DAPI (Del inglés, *4, 6 DiAmidin-2-Phenyl -Indole*). Se aislaron queratinocitos primarios epidérmicos de animales P3-P4 de los genotipos control y Rb^{ΔEpi};p21^{-/-}, siguiendo el protocolo descrito en el *apartado 10*. Una vez hecho el recuento celular se separaron 1x10⁶ de células por genotipo y se fijaron en 70% de etanol frío, añadiéndolo gota a gota en agitación, conservándose durante un mínimo de 12 horas a 4°C. Tras la fijación, se lavaron 2 veces con PBS, se centrifugaron a 1400rpm a 4°C y se suspendieron en una solución DAPI (2μg/mL DAPI y 0,05% NP40 en PBS). En el análisis se descartaron las células no viables y las agregadas. La visualización del perfil de ciclo se realizó en un citómetro convencional (BD LSR™ *Fortessa cell analyzer*), y para el análisis se utilizó el software *Cell cycle analysis tool, FlowJo 7.6*. Cada muestra corresponde a un único ratón por genotipo. Los ensayos se realizaron por triplicado para cada muestra.

16.- Extracción de ARN total de pieles de ratón.

El ARN total se aisló a partir de pieles de animales P3-P4 de los cuatro genotipos estudiados. La toma de muestras se realizó según se indica en el *apartado 4*. Las muestras se disgregaron mecánicamente y se homogenizaron mediante el sistema *Mixer Mill 301 (Retsch)*. La purificación de ARN total se llevó a cabo empleando un sistema específico para tejidos (*miRNAeasy Mini Kit, Qiagen*) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN genómico fue eliminado de las muestras mediante el tratamiento con la enzima ADNasa (*Rnase-Free Dnase Set Qiagen*). La integridad del ARN extraído se comprobó mediante el sistema de *Bioanalyzer Agilent* del Servicio de Genómica de la UCM, siguiendo el criterio de calidad basado en valores a partir de 1 de la relación 28S/18S o valores a partir de 8 del *RNA integrity number (RIN)* como medida del grado de degradación de la muestra (Schroeder, Mueller et al. 2006).

17.- Análisis de la expresión génica.

17.1. Análisis de biochips de expresión génica. Affymetrix.

A partir de 30 mg de piel se aisló y purificó ARN total (ver apartado 16). Cada muestra consistía en una mezcla de 5 ARN de extractos de piel por genotipo en igual cantidad. Las muestras por duplicado se enviaron a la Unidad de Genómica del Centro de Investigación del Cáncer (Universidad de Salamanca) para su hibridación y análisis utilizando un biochip de ratón de la plataforma *Affymetrix 430A* MOE430A que cuenta con 22.690 sondas. La intensidad de fluorescencia de cada sonda se midió mediante el programa informático *GCOS de Affymetrix®* el cual generó unos archivos con extensión “.CEL”, que contienen el nivel de señal fluorescente de cada sonda según su intensidad tras la hibridación. Utilizando el paquete de programas de la web *Gene Expression Profile Analysis Suite* (GEPAS, <http://www.gepas.org>) (Vaquerizas, Conde et al. 2005): se eliminó la señal de fondo con *RMA (Robust Multichip Analysis)* (Irizarry, Hobbs et al. 2003), se normalizaron los datos utilizando el método de los cuartiles (Bolstad, Irizarry et al. 2003), y se transformaron a logaritmo en base 2 ajustando los valores de expresión a 0 de media y 1 de desviación estándar. Como resultado se obtiene una tabla con los datos de la intensidad de la señal para cada una de las sondas de *Affymetrix* del biochip. Los análisis estadísticos posteriores (*SAM*, *T-test*) se hicieron con el programa informático *MultiExperiment Viewer (MeV)* (Saeed, Sharov et al. 2003).

Los genes expresados diferencialmente entre el ratón control y el $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se seleccionaron utilizando el análisis *Significance Analysis of Microarrays (SAM)* ($p < 0.01$, aumento de expresión > 2). Los análisis de enriquecimiento de los procesos o funciones biológicas proporcionados por la base de datos *Gene Ontology Biological Processes (GOBP)* (www.geneontology.org) se realizaron utilizando las herramientas disponibles en la web DAVID “DAVID Functional Annotation” (Dennis, Sherman et al. 2003), del *National Institute of Allergy and Infectious Diseases NIAID del National Institute of Health (NIH)* (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>). En los genes seleccionados, la búsqueda para los términos indicados por el *GOBP* se hizo usando todas las entradas en un listado ordenado, asignando a todas las categorías un valor p basado en la puntuación EASE (Hosack, Dennis et al. 2003), comprobándose la selección de forma manual.

17.2. Identificación de factores de transcripción mediante enriquecimiento genético por inmunoprecipitación de cromatina (ChEA).

La identificación de factores de transcripción ligados a los cambios de expresión génica observados, se estudió utilizando el Análisis de Enriquecimiento por Inmunoprecipitación de Cromatina (*Chip Enrichment Analysis; ChEA*) (Lachmann, Xu et al. 2010). El *ChEA* es una herramienta informática que engloba información de distintas bases de datos que reportan la unión de determinados factores de transcripción a zonas de promotores de determinados genes datadas experimentalmente. La identificación de los posibles factores de transcripción se llevó a cabo utilizando por defecto parámetros ya descritos previamente (Lachmann, Xu et al. 2010).

17.3. Análisis de enriquecimiento génico de los genes desregulados en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ por GSEA.

La comparativa de los genes diferencialmente expresados entre las pieles de recién nacido de animales control y $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, con la información publicada procedente de distintas fuentes: bases de datos incluidas en la colección “*c2.cpg.v3.0*” de la base de datos *MSigDB* (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>), bases de datos de diversas vías moleculares, publicaciones en *PubMed*, y el conocimiento de varios expertos, se abordó utilizando la herramienta informática *GSEA* (*Gene Set Enrichment Analysis*) (Subramanian, Tamayo et al. 2005). Esta herramienta permite averiguar qué genes o grupos de genes diferencialmente expresados de nuestro estudio aparecen significativamente representados en esas bases de datos. Se analizaron un total de 4.850 grupos de genes, y se seleccionaron los grupos estadísticamente significativos y relevantes (ver Tabla 4).

17.4. Análisis comparativo de la desregulación génica de ratón y cáncer humano. *Oncomine*.

Para estudiar la posible homología entre los genes sobreexpresados en las pieles de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y las muestras de CECyC humano, se efectuó un análisis de solapamiento con firmas de cánceres humanos contenidas en la base de datos *Oncomine* (www.oncomine.org) (Rhodes, Yu et al. 2004, Rhodes, Kalyana-Sundaram et al. 2007). La comparativa se realizó utilizando el test de *Fisher's*, considerando significativo un *Odds Ratio* > 1,5 y valor $p \leq 0,01$. Las coincidencias se buscaron utilizando distintos criterios:

diferentes tipos de CECyC, aumento de la fase del tumor, del grado, resultado clínico, metástasis, así como múltiples líneas celulares cancerosas derivadas de CECyC humano sensibles o resistentes a drogas terapéuticas específicas.

La obtención de la firma común de genes homólogos sobreexpresados tanto en las muestras de ratón como en las muestras humanas, se hizo a partir de una selección de 4 a 7 bases de datos de la Tabla 5 comparativa (ver Tabla 5 de *Resultados*), utilizando un valor $p < 0,00001$ como umbral medio entre las posibles comparativas. Finalmente, sólo se incluyeron los estudios procedentes de la base de datos *Pyeon*. La clasificación de los pacientes en dos grupos en base a sus diferencias en cuanto a supervivencia libre de metástasis, se obtuvo introduciendo la firma de genes comunes en la base de datos *Rickman* (Rickman, Millon et al. 2008), que contiene información del seguimiento de los eventos metastásicos de estos tumores primarios. El análisis por *Kaplan-Meier* mostró diferencias significativamente estadísticas entre estos dos grupos.

17.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico comparativo se llevó a cabo utilizando las herramientas informáticas para *Windows SPSS v17.0* y *GraphPad prism versión 5.00*. La comparativa entre dos muestras fue realizada por *T test* o test *U mann Whitney* tras la asignación de la posible distribución normal de los valores (test *Kolgorov*). Para comparar múltiples muestras se utilizaron los test *one/two way ANOVA* y un test posterior de *Bonferroni* para detectar las posibles diferencias significativas entre las muestras específicas. En la distribución por *Kaplan-Meier* la significancia se estimó mediante el test *log Rank*. En todos los casos, para significancias relevantes se asignó un valor $p < 0,05$.

18.- PCR a tiempo real (qRT-PCR).

La transcripción reversa del ARN para la obtención de ADN complementario (ADNc) se realizó a partir de 1µg de ARN total obtenido de las pieles de animales recién nacidos P3-P4. Para ello se empleó el sistema de retrotranscripción *Omniscript RT Kit de Qiagen*. La amplificación por PCR a tiempo real se realizó por duplicado usando los cebadores específicos y *Power SYBR Green PCR Master Mix de Applied Biosystems*. La reacción de PCR tuvo lugar con el aparato de *Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System* (3µl de agua libre de RNAasa, 0,5µl de cada primer (500mM), y 1µl de ADNc (1µg)). La detección por fluorescencia se llevó a cabo al final de cada paso de amplificación. Se realizó el test de *Melting* para verificar

la especificidad y ausencia de dímeros en los cebadores. A partir de los valores Ct (*Cycle threshold*) obtenidos por el aparato, se calculó la relación de eficiencia por cada pareja de cebadores de cada gen con el gen normalizador GusB.

Las condiciones de reacción de la PCR se describen a continuación:

°C	Tiempo	Ciclos
50	20"	
95	10'	
95	15"	40
60	1'	
95	15"	
60	1'	
95	30"	
60	15"	

Los cebadores específicos empleados en el estudio fueron los siguientes:

Cebadores	Secuencia 5'→3'
E2F1f	5'-TGCCAAGAAGTCCAAGAATCA-3'
E2F1r	5'-CTTCAAGCCGCTTACCAATC-3'
E2F2f	5'-GGCTTCCCCAGTCTTTTGTAT-3'
E2F2r	5'-TGTGAGCTTGTTCCCACGCTA-3'
E2F3af	5'-GCCTCTACACCACGCCACAAG-3'
E2F3ar	5'-CCTTCCAGCACGTTGGTGAT-3'
E2F4f	5'-GAACTGGACCAGCACAAGGT-3'
E2F4r	5'-CATGAGTCACGTAGGCCAAGC-3'
E2F5f	5'-GCGTCCTGGATCTCAAAGC-3'
E2F5r	5'-GATATCATAAATTCTTCGCTTTTGC-3'
E2F6f	5'-ACCACGCCTAGTCCAAGACAA-3'
E2F6r	5'-CCAACAATCCAGGTTCCATCA-3'
E2F7f	5'-TGTTACGTGAGACATCCGGTA-3'
E2F7r	5'-GGATGCTCTTGGGAGTCG-3'
E2F8f	5'-GGCATTGGAACATGTGCTTCG-3'
E2F8r	5'-GCTCATCACCGCTAAGGACTT-3'
DP1f	5'-GCTCAGTGCCAGAACTT-3'
DP1r	5'-TGGAGCTGTGACTGCTTCTG-3'
GusBf	5'-GAGGATCAACAGTGCCCAT-3'
GusBr	5'-CAGCCTCAAAGGGGAGGT-3'
Hes1f	5'-ACACCGGACAAACCAAAGAC-3'
Hes1r	5'-CGCCTCTTCTCCATGATAGG-3'
Smof	5'-GCAAGCTCGTGCTCTGGT-3'
Smor	5'-GGGCATGTAGACAGCACACA-3'

Ptch1f	5'-TGACAAAGCCGACTACATGC-3'
Ptch1r	5'-GTACTCGATGGGCTCTGCTG-3'
Axin2f	5'-GAGAGTGAGCGGCAGAGC-3'
Axin2r	5'-CGGCTGACTCGTTCTCCT-3'
C-Mycf	5'-CAGATCAGCAACAACCGCAA-3'
C-Mycr	5'-GACGTTGTGTGTCCGCCTCT-3'
Lgr5f	5'-CTTCACTCGGTGCAGTGCT-3'
Lgr5r	5'-CAGCCAGCTACCAAATAGGTG-3'
Gli1f	5'-CAGGGAAGAGAGCAGACTGAc-3'
Gli1r	5'-CGCTGCTGCAAGAGGACT-3'
Ovol1f	5'-GCGAGATCTACGTGCCAGTC-3'
Ovol1r	5'-CACCGATGCCTCTGGTTC-3'
TAp63f	5'-GTGTATGAACCTCCGAAAA-3'
TAp63r	5'-GAGGAGCCGTTCTGAATCTG-3'
ΔNp63f	5'-CAAAACCCTGGAAGCAGAAA-3'
ΔNp63r	5'-GAGGAGCCGTTCTGAATC-3'

RESULTADOS

1.- La eliminación de p21 agrava el fenotipo epidérmico de los ratones deficientes en pRb en la capa basal de la epidermis

1.1. Caracterización fenotípica de los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}.

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la ausencia de pRb conlleva una alteración de la homeostasis epidérmica debido a que ocasiona defectos en la proliferación y la diferenciación de los queratinocitos (Ruiz, Santos et al. 2004). Sin embargo, estos defectos resultan insuficientes para producir un desarrollo tumoral espontáneo, esto se debe a la compensación funcional ejercida por parte de p107, uno de los miembros de la familia de Retinoblastoma. Esta compensación va acompañada de un aumento de los niveles de esta proteína, alterando sus funciones (Lara, Santos et al. 2008). Se sabe además, que los ratones deficientes en p21 no manifiestan alteraciones epidérmicas (Paramio, Segrelles et al. 2001). Por otra parte, datos de expresión génica global obtenidos previamente en nuestro grupo, a partir de queratinocitos primarios procedentes de epidermis de ratones pRb^{ΔEpi}, mostraban una inducción del gen *Cdkn1a* (p21) (Lara, Garcia-Escudero et al. 2008, Lara, Santos et al. 2008). Se han descrito múltiples funciones de p21 entre otras, el control de la proliferación en ausencia de pRb (Dimri, Nakanishi et al. 1996). Esto indicaría que en ausencia de pRb, p21 podría estar ejerciendo una función compensatoria en la epidermis limitando la proliferación de los queratinocitos.

Para comprobar esta hipótesis, se planteó el estudio de los efectos que produce la eliminación de pRb en la epidermis de animales deficientes en p21 (pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}). Estos animales se obtuvieron cruzando ratones pRb^{ΔEpi} con ratones p21^{-/-} (ver *Materiales y Métodos*). En primer lugar, se comparó el fenotipo de los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} con los ratones control, pRb^{ΔEpi} y p21^{-/-}. Los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} nacían con la frecuencia mendeliana esperada, pero al poco tiempo de nacer mostraban alteraciones fenotípicas importantes: tamaño reducido, apariencia frágil, descamación (hiperqueratosis) (Fig. 1A), alopecia (la pérdida de pelo es más acusada en cara y hocico) (Fig. 1A, B) generación espontánea de heridas (Fig. 1C) y microftalmia (Fig. 1D). No se observó ninguna de estas anomalías en los ratones del resto de los genotipos estudiados. Además, en comparación con los animales control, pRb^{ΔEpi}, y p21^{-/-}, el peso de los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} era menor, y aunque la diferencia se mantenía a lo largo de toda la vida del animal era más acusada durante las primeras semanas tras el nacimiento (Fig. 1E).

Resultados

Asimismo, se evaluó la supervivencia de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ frente a los otros tres grupos en estudio, monitorizando un conjunto representativo de 32 ratones por genotipo durante un año. Los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ presentaron una supervivencia severamente reducida, registrándose una tasa de mortalidad entorno al 80% durante las primeras 13 semanas de vida (Fig. 1F).

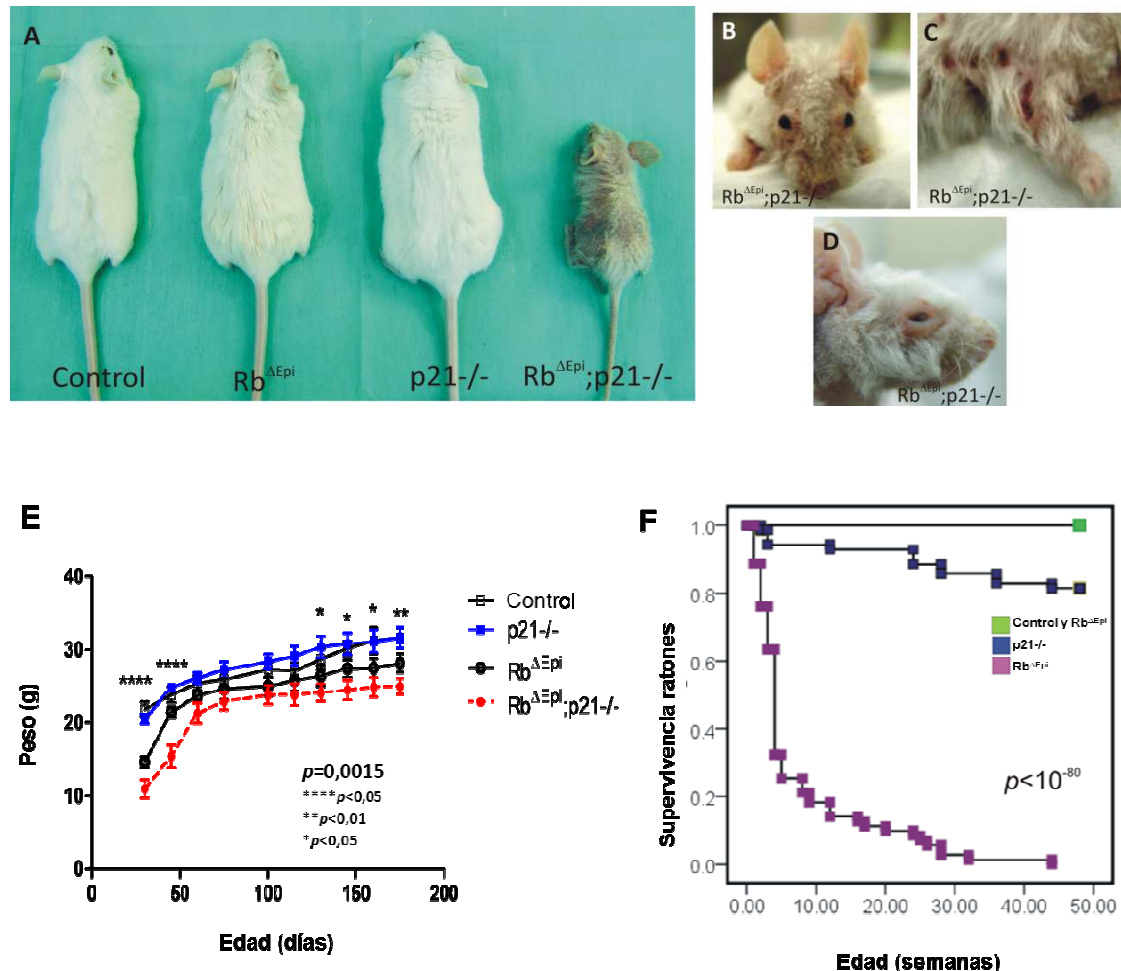


Fig.1. Apariencia, peso y supervivencia en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A) Aspecto macroscópico de ratones de 30 días control, $pRb^{\Delta Epi}$, $p21^{-/-}$ y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. B) Detalle de la cabeza y hocico mostrando la pérdida de pelo. C) Heridas espontáneas del ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. D) Microftalmia. E) Curva representando la ganancia de peso (g) frente a la edad (días) de los cuatro genotipos en estudio. El análisis estadístico se hizo mediante ANOVA de dos vías. F) Curva Kaplan Meier mostrando la supervivencia global de los genotipos citados. El valor p fue obtenido mediante el test Log rank.

Con objeto de comprobar si, como en el caso de los animales $pRb^{\Delta Epi}$, en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se producía un aumento de los niveles de alguna de las proteínas miembro de la familia de Retinoblastoma (p107 ó p130), se analizaron sus niveles a partir de extractos de proteínas procedentes de queratinocitos primarios de los cuatro grupos en estudio, mediante *western blot*. Se comprobó que la ausencia de pRb ocasionaba un incremento de los niveles de p107, y p21 (Fig. 2). Estos resultados confirman los obtenidos previamente en queratinocitos

primarios y epidermis de ratones deficientes en pRb^{ΔEpi} (Lara, Garcia-Escudero et al. 2008, Lara, Santos et al. 2008, Costa, Paramio et al. 2013). Al igual que los queratinocitos pRb^{ΔEpi}, los queratinocitos pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mostraron un incremento de p107, del factor de transcripción E2F1 y del supresor tumoral p53, (Lara, Garcia-Escudero et al. 2008, Lara, Santos et al. 2008) sin que la pérdida adicional de p21 incrementase más los niveles de estas proteínas.

Como cabía esperar, no se detectó pRb en los queratinocitos pRb^{ΔEpi} ni en los queratinocitos pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}, en los que tampoco se detectó p21 (Fig. 2).

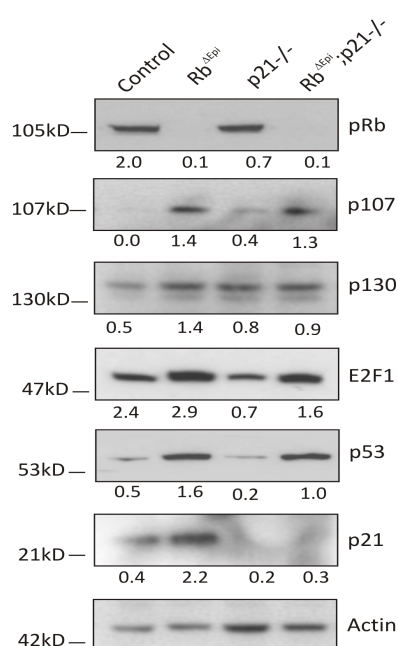


Fig 2. Western blot representativo de extractos proteicos de queratinocitos primarios de ratón de los genotipos citados mostrando la expresión de las proteínas mencionadas. Cada línea contiene una mezcla de extractos proteicos de queratinocitos de la epidermis de tres ratones. El número situado debajo de cada banda indica el valor densitométrico de cada banda normalizada de acuerdo a su valor correspondiente de Actina.

Para profundizar en las consecuencias de la ausencia conjunta de pRb y p21 en la epidermis, se realizó un análisis histopatológico de pieles de animales a 10 días post-nacimiento (P10), procedentes de los cuatro grupos en estudio: control, p21^{-/-}, pRb^{ΔEpi} y pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. El análisis histológico desveló que la epidermis de un ratón control (Fig. 3A) y la de un ratón p21^{-/-} (Fig. 3B) eran indistinguibles y no presentaban ninguna alteración apreciable, lo que confirma las observaciones previas (Paramio, Segrelles et al. 2001). La epidermis de un ratón pRb^{ΔEpi} mostraba hiperplasia (incremento en el número de capas celulares) e hiperqueratosis (engrosamiento del estrato córneo) moderadas (Fig. 3C), tal y como estaba descrito previamente (Ruiz, Santos et al. 2004). Estas alteraciones se agudizaban profundamente con la pérdida adicional de p21. La epidermis del ratón pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}, presentaba hiperplasia e hiperqueratosis severa, distrofia de los folículos pilosos con glándulas sebáceas aisladas e hipertróficas (Fig. 3D). Además, en piel de animales a 30 días post-nacimiento (P30) se detectó presencia de infiltrados inflamatorios masivos (Fig. 3E) y de

células nucleadas en el estrato córneo (paraqueratosis) (detalle señalado con flechas (Fig. 3E), lo que es indicativo de alteraciones en el proceso de la diferenciación terminal epidérmica. Ninguna de estas alteraciones se observaron en las epidermis de los animales control, p21^{-/-} y pRb^{ΔEpi}.

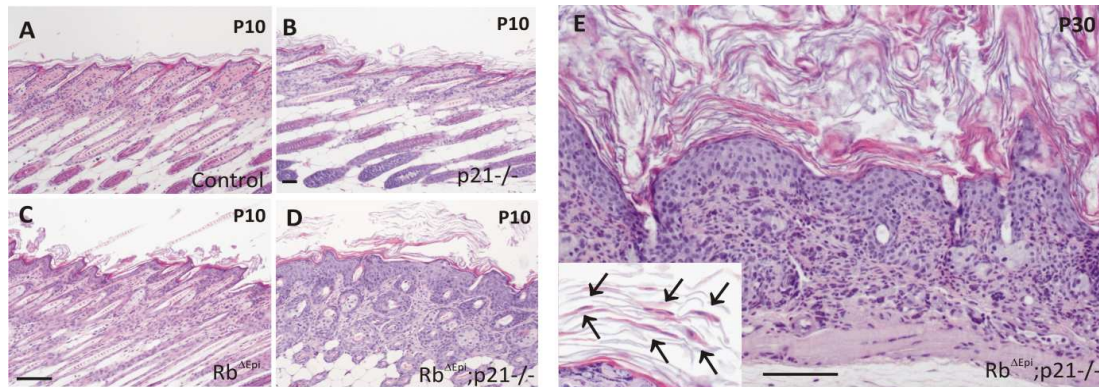


Fig. 3. Fenotipo epidérmico de los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. A-E Secciones histológicas representativas de la piel de ratones a P10 control (A), p21^{-/-} (B), pRb^{ΔEpi} (C) y pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} (D) y piel de ratón pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} a P30 (E) teñidas con hematoxilia y eosina. Nótese el fenotipo epidérmico en los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} caracterizados por hiperplasia, hiperqueratosis y paraqueratosis (detalle en E), e infiltrados celulares en la dermis (E).

1.2. La epidermis del ratón pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} muestra un aumento proliferativo.

La eliminación de pRb en epidermis da lugar a un incremento proliferativo de las células situadas en la capa basal, y a una localización anómala de células en estado proliferativo en capas suprabasales (Ruiz, Santos et al. 2004). Con estos antecedentes, se quiso averiguar si la pérdida adicional de p21 agravaría este efecto. Para ello se realizó un análisis de proliferación por incorporación de BrdU en las pieles de animales control (Fig. 4A, F), p21^{-/-} (Fig. 4B, F), pRb^{ΔEpi} (Fig. 4C, F) y pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} (Fig. 4D, F). El análisis se realizó mediante doble inmunofluorescencia para la detección de BrdU y K5 como marcador de células basales mitóticamente activas, o K10 como marcador de células diferenciadas de la capas suprabasales. El resultado demostró que en ausencia de p21, la incorporación de BrdU en los queratinocitos de la capa basal de la epidermis no varía respecto al control. Sin embargo, la ausencia de pRb provoca un aumento significativo en la incorporación de BrdU comparado con el control. En los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} el incremento era mayor, como consecuencia de la pérdida adicional de p21. Del mismo modo, se vio que la ausencia de p21 incrementaba notablemente la incorporación anómala de BrdU observada en los queratinocitos de capas epidérmicas suprabasales de los animales pRb^{ΔEpi} (Fig. 4E, G).

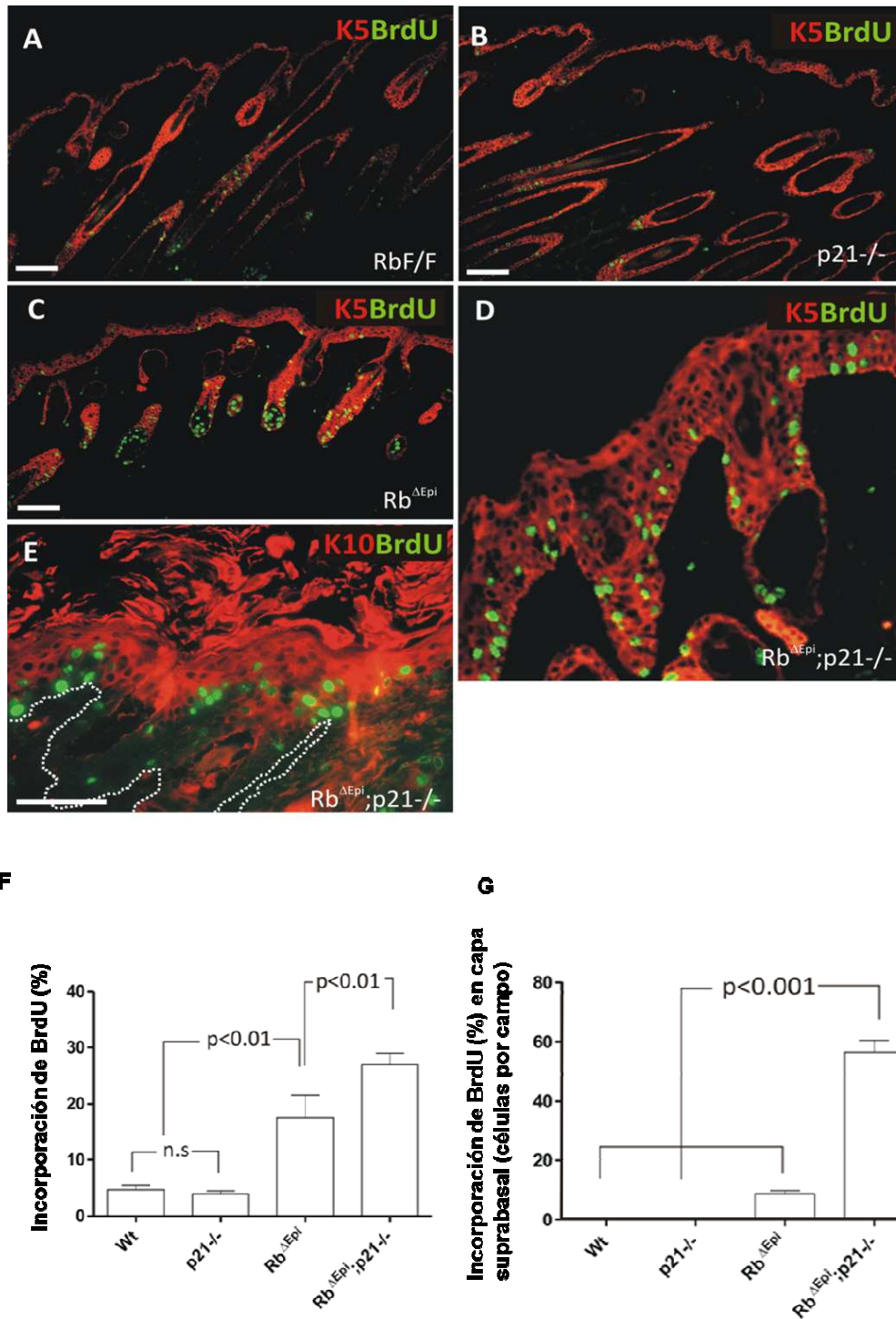


Fig. 4. Proliferación epidérmica en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-D) Imágenes representativas de la doble inmunofluorescencia mostrando la incorporación de BrdU (en verde) en la epidermis de ratón control (A), $p21^{-/-}$ (B), $pRb^{\Delta Epi}$ (C) y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (D, E) junto con K5 (en rojo en A, B, C, D) y K10 (en rojo en E). Barras=100 μ m. La línea discontinua en (E) señala el borde dermo-epidérmico. F) Análisis cuantitativo de la incorporación de BrdU en células basales positivas para K5 en los ratones de todos los genotipos citados. G) Análisis cuantitativo de la incorporación de BrdU en células suprabasales positivas para K10 en los ratones de los genotipos citados. Los datos proceden de tres experimentos independientes donde se ha calculado el promedio de cinco secciones clasificadas procedentes de al menos tres ratones de edades similares por genotipo. Los valores p se obtuvieron mediante ANOVA de una vía y la comparación correspondiente mediante el test de Bonferroni.

Para analizar en más detalle el proceso proliferativo, se llevó a cabo el estudio del perfil de ciclo celular de los queratinocitos primarios aislados de la piel de animales recién nacidos control y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. El análisis se realizó por citometría de flujo y los resultados mostraron con respecto al control, un aumento del porcentaje de células en fase S/G2-M en los queratinocitos de animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (37,44% $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ frente a 23,55% controles, ratio 1.5) (Fig. 5). Este resultado confirma una mayor tasa proliferativa de los queratinocitos $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

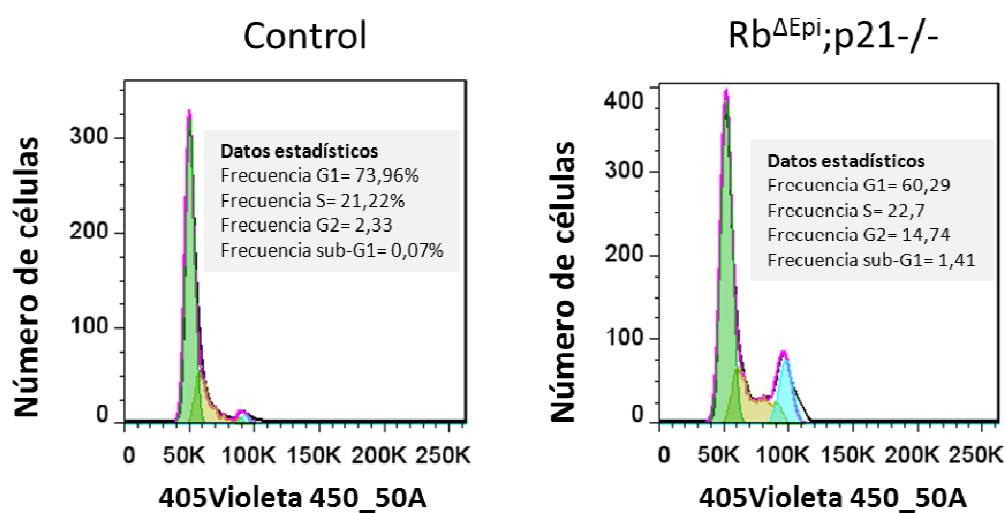


Fig. 5. Perfil de ciclo celular. Análisis del perfil de ciclo celular de los queratinocitos primarios aislados de la piel de ratones recién nacidos control y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, marcados con DAPI. En cada histograma se adjunta un cuadro resumen en gris con los porcentajes de células contabilizadas en cada fase del ciclo celular en los dos genotipos.

Estudios previos han demostrado que pRb regula la transición de las fases G1/S del ciclo celular interaccionando directamente con los factores E2Fs (Weinberg 1995, Sherr and McCormick 2002, Burkhardt and Sage 2008). Además, se ha descrito que en ausencia de pRb, p21 se asocia directamente con factores de transcripción de la familia de E2F limitando su actividad transcripcional (Dimri, Nakanishi et al. 1996). Por ello, se pensó que la actividad de los factores E2F podría verse afectada por la ausencia conjunta de pRb y p21 en los queratinocitos. Para comprobarlo, se analizó la actividad de E2F mediante ensayos de luciferasa empleando cultivos primarios de queratinocitos de los cuatro genotipos en estudio. Los resultados no mostraron diferencias en la actividad E2F entre los queratinocitos control y los $p21^{-/-}$. Sin embargo, se observó que la actividad de los factores E2Fs se incrementaba significativamente ($p<0,01$) en los queratinocitos $pRb^{\Delta Epi}$ con respecto a los control y los $p21^{-/-}$ (Fig.6), en concordancia con el aumento de los niveles de E2F observados (Fig. 2). Además, el incremento de la actividad de E2F era significativamente mayor ($p<0,01$) en los queratinocitos $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ en comparación con lo observado en las células $pRb^{\Delta Epi}$ (Fig.6). Aunque en este

caso, los niveles de E2F no se ven incrementados significativamente por la pérdida adicional de p21 (Fig.2).

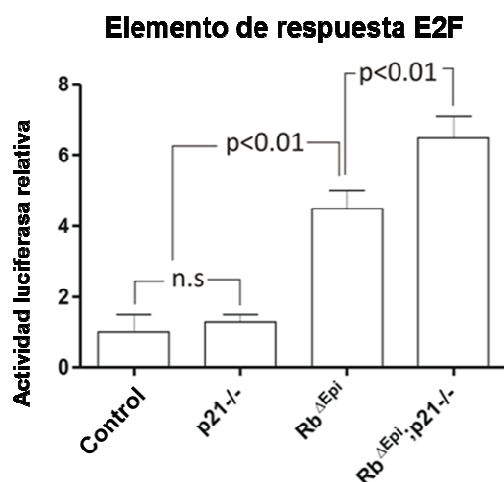


Fig. 6. Análisis de la actividad de los elementos E2F en los queratinocitos pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. Actividad luciferasa relativa de los elementos de respuesta E2F en los queratinocitos primarios de los genotipos citados. Los datos provienen de tres experimentos independientes. Los valores de luciferasa fueron normalizados a los obtenidos por los queratinocitos control Rb F/F. Los valores p se obtuvieron por análisis ANOVA de una vía y la comparación correspondiente con el test de Bonferroni.

Resultados de nuestro grupo habían demostrado que los queratinocitos pRb^{ΔEpi} muestran un desacoplamiento entre los procesos de proliferación y diferenciación (Ruiz, Santos et al. 2004) por lo que se quiso averiguar si este efecto se agudizaba en las células pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. Para ello, se analizó la proliferación de los queratinocitos primarios sometidos a un proceso de diferenciación forzada mediante el incremento de la concentración de calcio en el medio de cultivo (Ruiz, Santos et al. 2004). En concordancia con resultados previos (Ruiz, Santos et al. 2004), tras 24h en alto calcio las células pRb^{ΔEpi} sufren un retraso en la parada del ciclo celular en comparación con las células control o deficientes en p21 (Fig. 7). Sin embargo, mientras que tras 48h y 72h en condiciones de alto calcio, los queratinocitos control, p21^{-/-} y pRb^{ΔEpi} no presentaron tasas significativas de incorporación de BrdU, un número elevado de células pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} seguían proliferando (Fig. 7). Además, cuando se re-estimularon a proliferar todos los cultivos, disminuyendo de nuevo la concentración de calcio del medio, se observó que las células control eran incapaces de entrar de nuevo en el ciclo celular y proliferar, indicando que habían alcanzado una diferenciación terminal, mientras que las células p21^{-/-}, pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}, y en menor medida las células pRb^{ΔEpi}, mostraron tasas proliferativas cercanas a las mostradas inicialmente en las células no diferenciadas (Fig. 7).

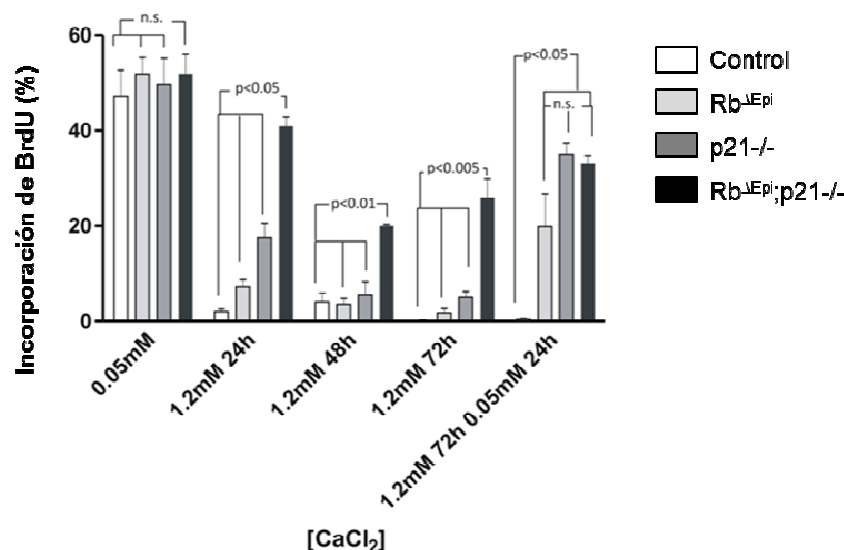
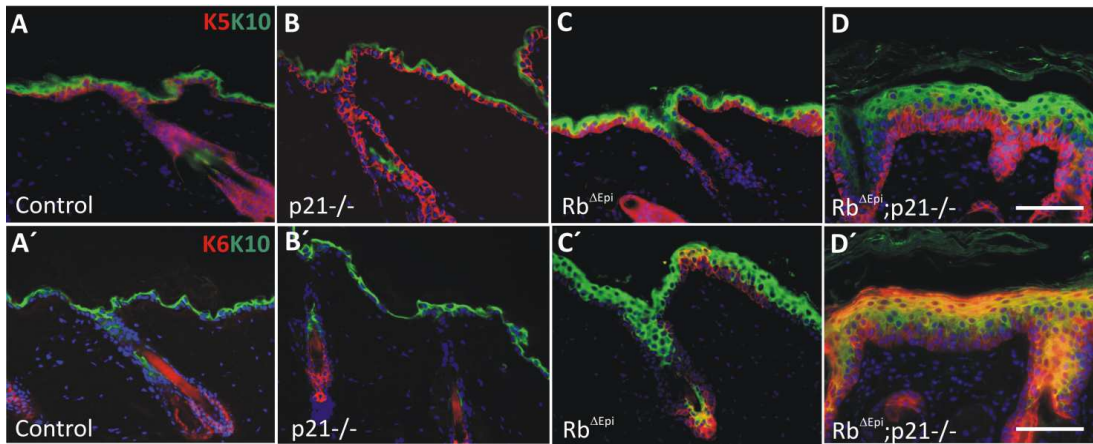


Fig. 7. Desacoplamiento entre los procesos de proliferación y diferenciación en los queratinocitos pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. Porcentaje de incorporación de BrdU en queratinocitos primarios de los genotipos citados bajo condiciones de bajo calcio (0,05mM) y alto calcio (1,2mM) en el medio, a los correspondientes tiempos indicados, y tras la re-estimulación con medio de bajo calcio. Los datos proceden de tres experimentos independientes donde se han seleccionado al menos 1000 células para cada uno y se han calculado los valores promedios. Los valores p se obtuvieron a partir de ANOVA de una vía y posterior test de Bonferroni.

1.3. Los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} presentan alteraciones en la diferenciación epidérmica.

La proliferación anómala de las células de las capas suprabasales junto con la existencia de paraqueratosis en la epidermis de los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} (detalle Fig. 3E) es indicativo de un fallo en el proceso de diferenciación de la epidermis. Para confirmar este hecho, se caracterizó la diferenciación epidérmica en los ratones de los cuatro genotipos estudiados, utilizando la expresión diferencial de las queratinas como marcadores de las distintas fases de este proceso. Las pieles de ratones control (Fig. 8A, A') y p21^{-/-} (Fig. 8B, B') mostraron una expresión y localización idéntica de K5, y una correcta expresión folicular de K6; mientras que la piel de los ratones pRb^{ΔEpi} mostraba una moderada expansión de estas queratinas (Fig. 8C, C'), tal y como se había descrito previamente (Ruiz, Santos et al. 2004). Sin embargo, las alteraciones en diferenciación observadas en la epidermis del ratón pRb^{ΔEpi} se agudizaban en las pieles de los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}, con una mayor expansión de la expresión de la K5 y la K10, que se hallaba confinada a las capas más externas, y una expresión masiva y anómala de la K6 en la epidermis interfolicular (Fig. 8D, D'). Estos resultados confirmaban el fallo en el proceso de diferenciación epidérmica de los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}.



1.4. La eliminación de pRb en la epidermis de ratones deficientes en p21 desencadena un proceso inflamatorio en la piel.

La deficiencia conjunta de pRb y p21 en la epidermis de ratón ocasionó la aparición de frecuentes alteraciones en la piel: pústulas epiteliales (Fig. 9A), fragilidad y rotura epidérmica (Fig. 9B), generación espontánea de heridas (Fig. 9C) y presencia de infiltrados inflamatorios masivos, ya visualizados en cortes histológicos teñidos con H&E (Fig. 3E) y detectados mediante la presencia de células positivas para el marcador linfocitario CD45 (Fig. 9D). No se detectó ninguna de estas alteraciones en ratones control, $p21^{-/-}$ y $pRb^{\Delta Epi}$.

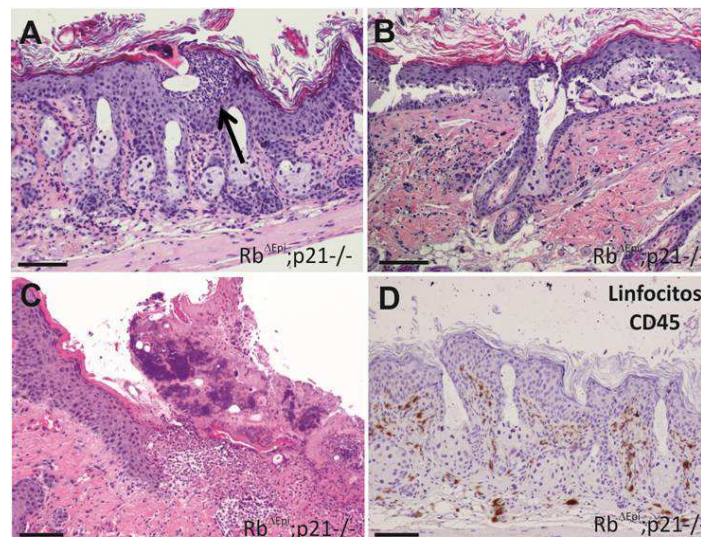


Fig. 9. Alteraciones epidérmicas e infiltrado inflamatorio masivo en las pieles de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-D) Secciones de piel procedente de ratones adultos mostrando la formación de abscesos, señalada con una flecha (A), fragilidad epidérmica (B), heridas espontáneas (C). D) Inmunohistoquímica representativa de una sección de piel $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mostrando la presencia de linfocitos detectados como células CD45 positivas. Barras=100 μ m.

Resultados

En base a estas observaciones, se decidió caracterizar en mayor profundidad los componentes del infiltrado inflamatorio en la piel de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. La caracterización, mediante inmunohistoquímica en la piel de los ratones de los cuatro genotipos a 30 días, reveló que la piel de los animales control (Fig. 10A-D) y $p21^{-/-}$ (Fig. 10A'-D') mostraban un número normal de linfocitos T (T-CD3 ϵ), de macrófagos (F480), de mastocitos (metacromasia para el azul de toluidina) y de células T $\gamma\delta$, correspondientes a la inmunovigilancia habitual de la piel. En los animales $pRb^{\Delta Epi}$ se observó un incremento moderado de la presencia de estas células (Fig. 10A''-D'') indicativo de una ligera inflamación, según habíamos reportado previamente (Martinez-Cruz, Santos et al. 2009). Por el contrario, la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mostraba un elevado número de linfocitos T (Fig. 10A'''), de macrófagos (Fig. 10B'''), de mastocitos (Fig. 10C''') y de células T $\gamma\delta$ (Fig. 10D''') indicativo de un proceso inflamatorio.

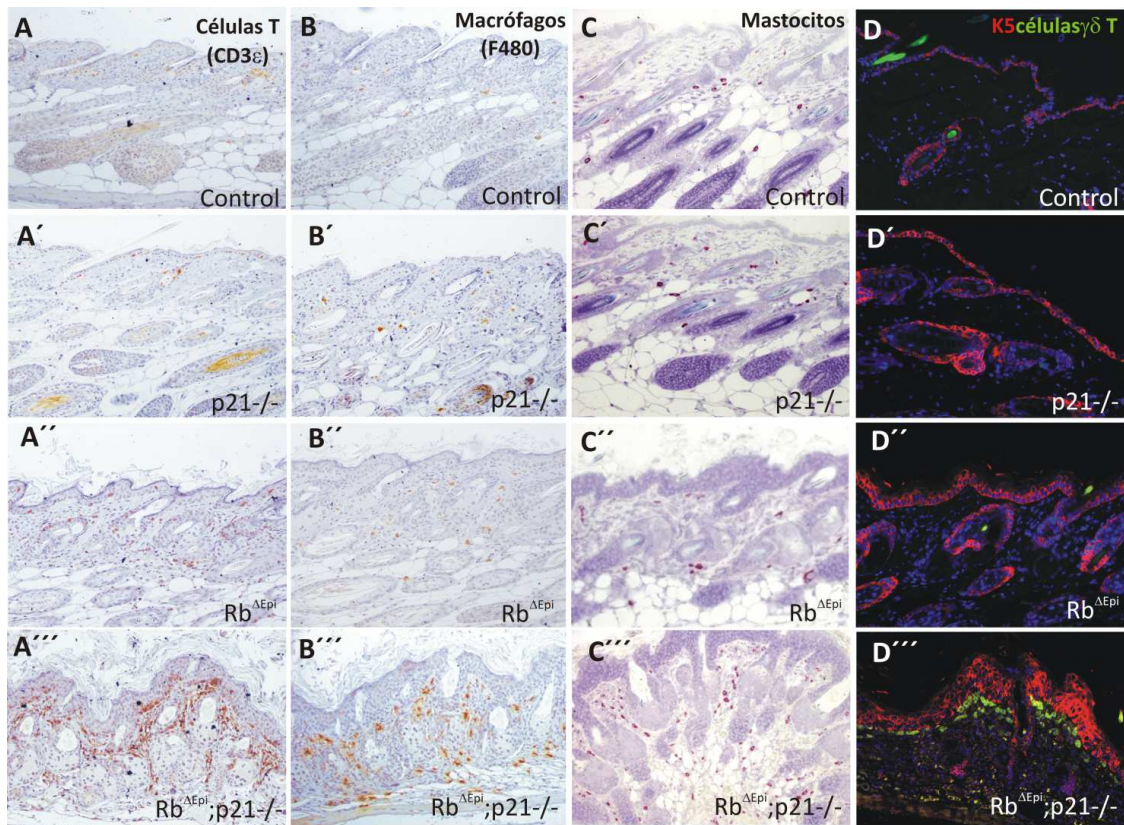


Fig. 10. Proceso inflamatorio en las pieles de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ de 30 días. Imágenes representativas por inmunohistoquímica (A-C''') e inmunofluorescencia (D-D''') mostrando la presencia de células T (CD3 ϵ positivas, A-A'''), macrófagos (F480 positivos, B-B'''), mastocitos (C-C''') y células $\gamma\delta$ TCR (D-D''') en pieles de animales de 30 días control (A-D), $p21^{-/-}$ (A'-D'), $pRb^{\Delta Epi}$ (A''-D'') y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (A'''-D'''). Barra=100 μ m.

Dado que la respuesta inflamatoria en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se analizó a 30 días, decidimos comprobar si esta respuesta se detectaba ya en la piel de los animales recién nacidos, o bien se desarrollaba progresivamente con la edad. Para ello, se analizó la presencia de linfocitos T-CD3 ϵ en pieles de animales control, $p21^{-/-}$, $pRb^{\Delta Epi}$ y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. El resultado no mostró diferencias significativas entre los cuatro grupos en estudio en relación al número de células inmunes que no difería del habitual (Fig. 11), lo que parece indicar que los animales recién nacidos $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ presentaban una inmunovigilancia normal.

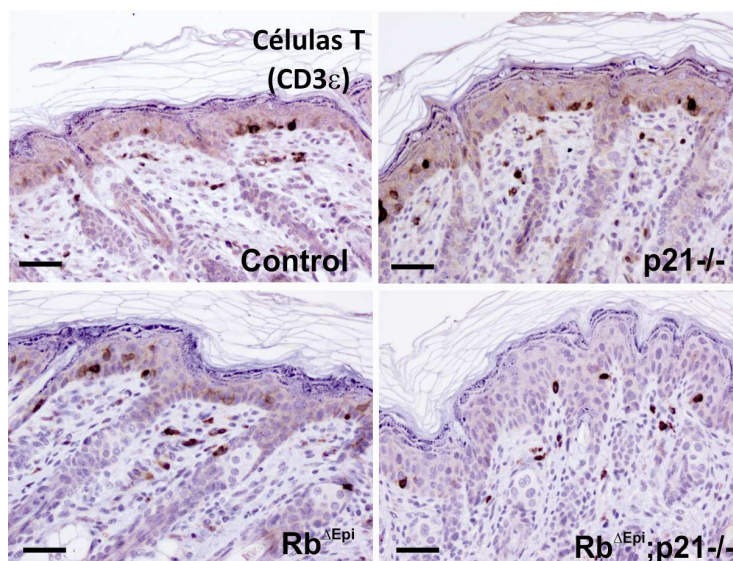


Fig. 11. Las pieles de los animales recién nacidos (P3) $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ no muestran una respuesta inflamatoria. Imágenes representativas por inmunohistoquímica mostrando la presencia de células T (CD3 ϵ positivas) en pieles de animales recién nacidos (P3) de los cuatro genotipos estudiados. Barra=100 μ m.

Los procesos inflamatorios en la piel están asociados a un incremento en la actividad de las vías de señalización molecular de NF κ B y Stat3 (Mantovani, Allavena et al. 2008). Para comprobar si estas vías están afectadas antes de que se desencadene la respuesta inflamatoria, se analizó por *western blot* el estado de activación de los miembros de la vía NF κ B y Stat3 a partir de extractos de pieles de recién nacido, estudiando la expresión de sus elementos clave. Los resultados mostraron reducción en los niveles del inhibidor de la vía, I κ B α (Fig. 12A, B) y activación de Stat3 y NF κ B en las pieles de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, como indica el incremento en los niveles de las formas fosforiladas (activas) de Stat3 (Fig. 12A, C) y p65 (Fig. 12A, D). Los niveles de p65 se incrementaron moderadamente en las pieles $pRb^{\Delta Epi}$ y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Fig.12A, y E). Por último, no se observaron diferencias significativas en la expresión de otros elementos pertenecientes a la señalización de estas vías moleculares, como niveles totales de Stat3, IKK β , IKK α e IKK γ (Fig. 12A).

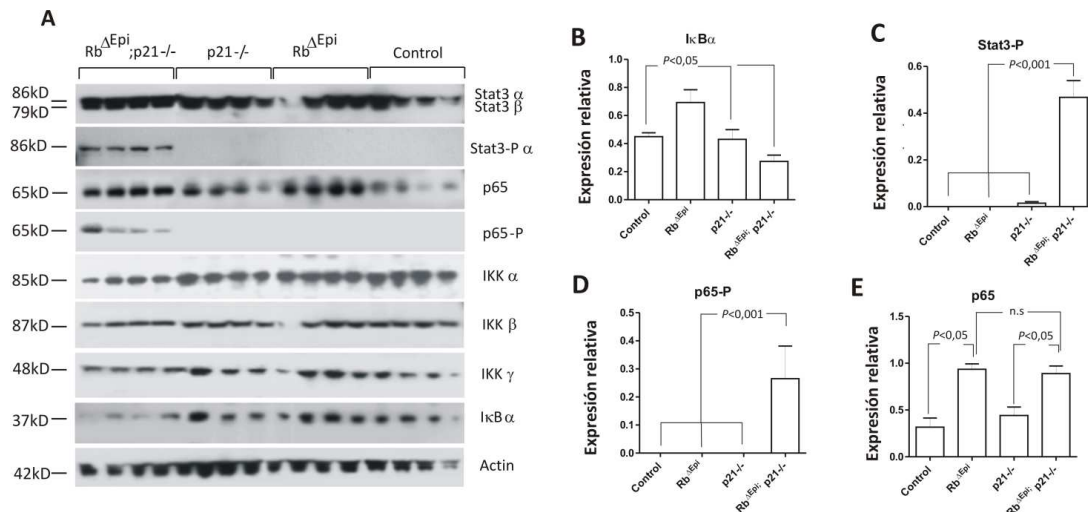


Fig. 12. Vías de señalización NFκB y Stat3 en la piel de recién nacido de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. (A) western blot representativos mostrando la expresión de las proteínas especificadas en extractos de piel de recién nacidos de los ratones citados. Cada línea contiene una mezcla de extractos de piel de tres ratones recién nacidos por genotipo. (B-E) Análisis densitométricos de las diferentes bandas de las proteínas citadas que sufren una variación significativa, normalizados de acuerdo a su valor correspondiente de Actina. Se representa el valor promedio de las distintas muestras por genotipo y proteína correspondiente. Los valores p se obtuvieron utilizando ANOVA de una vía y la comparación específica con el test de Bonferroni.

Los resultados obtenidos en la piel de los animales recién nacido apuntan a que la doble deficiencia de pRb y p21 da lugar a una activación de vías de señalización relacionadas con la respuesta inflamatoria que estarían contribuyendo a la inflamación observada en los animales a 30 días. Con objeto de comprobar si esta inflamación está mediada por las propias células del componente inflamatorio que son reclutadas hacia la piel, o bien es una consecuencia de las alteraciones presentes en los queratinocitos $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, se realizaron trasplantes de piel de recién nacido de los cuatro genotipos estudiados sobre hospedadores inmunodeficientes NOD/SCID (deficientes en linfocitos T y B maduros, en macrófagos y dendríticas funcionales y en el sistema del Complemento). Los trasplantes se mantuvieron un máximo de tres meses, transcurrido ese tiempo se sacrificaron y se analizó la respuesta inmune en las muestras de piel trasplantada, mediante inmunohistoquímica. Únicamente, en los trasplantes de piel de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se detectó un aumento de las poblaciones inmunes de linfocitos T-CD3ε (Fig. 13A), macrófagos (positivas para F480) (Fig. 13B), mastocitos (Fig. 13C) y células Tγδ (Fig. 13D). Este incremento del componente inflamatorio se producía pese a la inmunodeficiencia del hospedador, lo que indica que estas células inmunes presentes en el injerto de piel del recién nacido son capaces de sobrevivir al trasplante y proliferar una vez establecido el mismo. Los trasplantes de piel control, $pRb^{\Delta Epi}$ y $p21^{-/-}$ no mostraron esta respuesta inflamatoria.

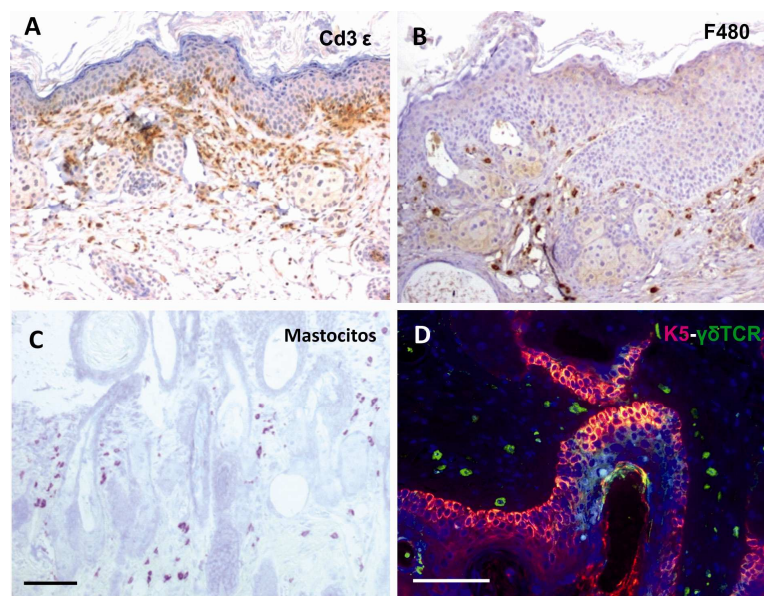


Fig. 13. Imágenes representativas de células inflamatorias detectadas en los trasplantes de piel de recién nacido $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$. A-C) Inmunohistoquímica de la presencia de células T-CD3ε (A), macrófagos (B) y mastocitos (C). D) Doble inmunofluorescencia de los trasplantes $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$ mostrando las células positivas para el marcador de K5 (en rojo) y las células inflamatorias $\gamma\delta$ TCR (en verde).

En paralelo, se llevó a cabo la identificación de las citoquinas y quimioquinas implicadas en la respuesta inflamatoria. Para ello se hizo un análisis del perfil de expresión de 40 citoquinas y quimioquinas utilizando un panel de detección múltiple (Fig. 14A) (RyD Systems, ver apartado Mat. y Mét.). En el estudio se compararon los niveles de estas proteínas a partir los extractos proteicos de piel procedente de: animales de los cuatro genotipos de 30 días, animales recién nacidos $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$ (sin signos inflamatorios aparentes, Fig. 11) y de los injertos de piel de recién nacido $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$ transplantada. Cada muestra se componía de una mezcla de tres pieles por animal y genotipo. El análisis cuantitativo de los experimentos indicó que en comparación con los extractos de piel control, $p21^{-/-}$ y $pRb^{\Delta Epi}$, los extractos de piel de ratones a 30 días $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$ presentaban un incremento en los niveles de proteínas quimiotácticas proinflamatorias que en su mayoría forman parte de la inmunidad innata y se encuentran implicadas en numerosos procesos tumorales (Tabla 1 y Fig. 14B, B').

Tabla 1. Listado y función de citoquinas y quimioquinas que muestran un incremento en sus niveles en la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

<i>Quimioquina-Citoquina</i>	<i>Función</i>
GCSF	Factor estimulante de granulocitos
GMCSF	Factor estimulante de granulocitos-macrófagos
IL16	Modula la maduración de células dendríticas y la función del linfocito T
CXCL1	Implicado en el reclutamiento de neutrófilos, cicatrización de heridas en epidermis y desarrollo de tumores escamosos; además la unión a su receptor activa las cascadas moleculares de ERK1/2, JAK2-STAT3, PI3K relacionadas con la activación de la proliferación, angiogénesis y migración
CCL3	Quimioatrayente de monocitos, dendríticas, linfocitos CD4+, CD8+ y NK; participa regulando el tráfico intratumoral de leucocitos y fibroblastos favoreciendo la neovascularización y metástasis
CXCL2	Sus niveles se encuentran incrementados en diversos tipos de tumores (de colon, esofágico y líneas celulares de melanoma) favoreciendo la tumorigénesis
TREM1	Importante en el disparo de la respuesta inflamatoria y sobreexpresado en macrófagos asociados a tumores

Además, los extractos de piel de ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ a 30 días mostraron un descenso en los niveles de CCL1 y CXCL9 (Tabla 2 y Fig. 14B, B’):

Tabla 2. Listado y función de citoquinas y quimioquinas que muestran un descenso en sus niveles en la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

<i>Quimioquina-Citoquina</i>	<i>Función</i>
CCL1	Implicado en la finalización de la respuesta inmune en la determinadas en dermatitis
CXCL9	Quimioatrayente de linfocitos T tumor-infiltrantes en sangre periférica y de células NK con actividad angiostática

Sin embargo, los niveles relativos de estas proteínas varían cuando se comparan animales a 30 días (ver párrafo anterior), con recién nacidos, en los que se detecta un incremento significativo en los niveles de GMCSF, CXCL1 y TREM1 y una represión de CXCL9 y CCL1, y con pieles trasplantadas, en las que se detecta un aumento de GCSF, GMCSF, IL16, CXCL1, CXCL2, TREM1, y de nuevo represión de CXCL9 y CCL1 (Fig. 17B, B’).

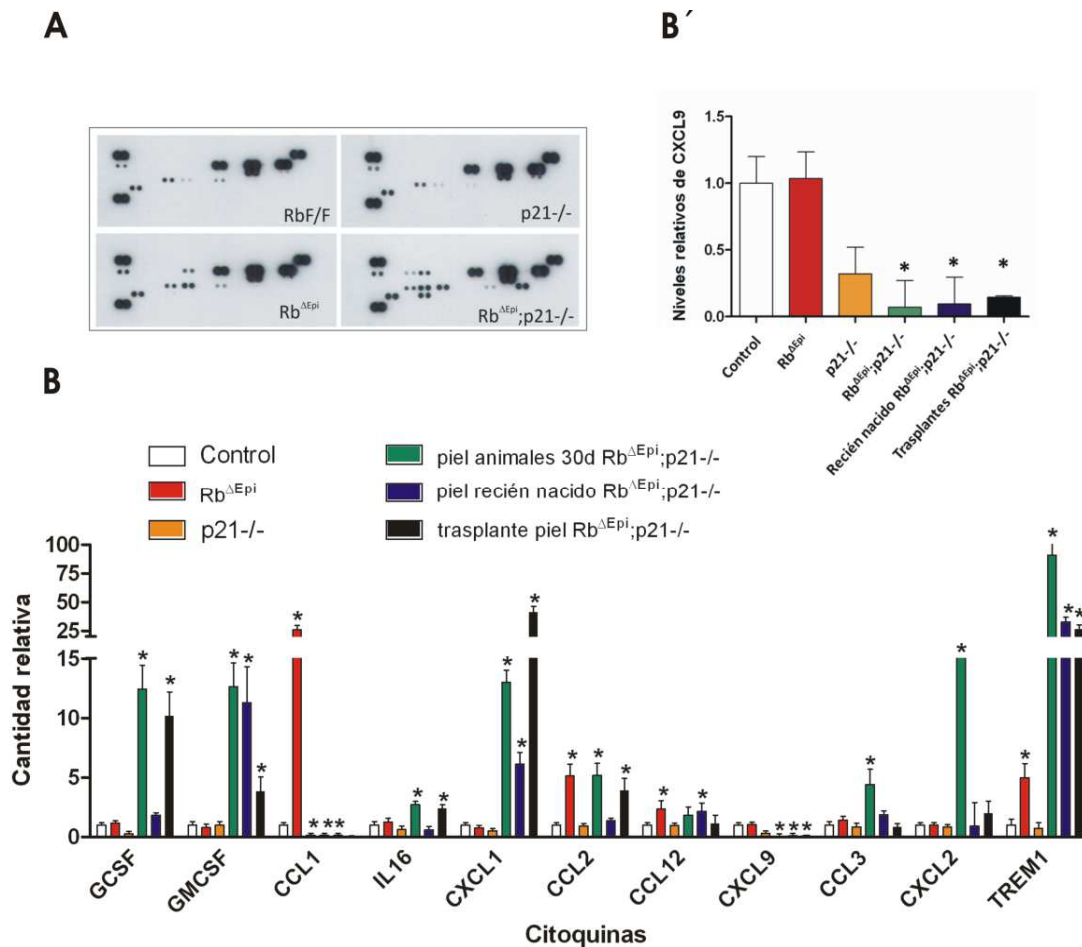


Fig. 14. Producción de citoquinas en la piel de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-B) Ejemplo representativo del panel de muestras de piel de ratones de 30 días (A) y cuantificación-resumen (B) del perfil de citoquinas y quimioquinas analizados en extractos proteicos totales de piel ($n=3$) obtenidos de los ratones de los genotipos citados. La expresión de citoquinas/quimioquinas de piel de recién nacido y trasplantes de piel de recién nacido $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se incluyeron para la comparación. (B') Detalle de la cuantificación de CXCL9. Los datos proceden de tres experimentos independientes. Los valores medidos por densitometría se normalizaron con los obtenidos en las muestras control, y cálculo del error estándar. * indica un valor $p < 0,05$ y fue obtenido mediante un ANOVA de dos vías y posterior test de Bonferroni.

Nuestros datos apuntan a que la ausencia de p21 y pRb en la piel de un ratón recién nacido, aunque no desencadena una respuesta inflamatoria evidente, presenta ya elevados niveles de quimioatrayentes (GM-CSF, CXCL1 y TREM1) y represión de CXCL9 y CCL1, característicos de la inmunidad innata, además de la activación de vías pro-inflamatorias (NF κ B y Stat3), estableciendo un entorno favorable para iniciar una respuesta inflamatoria. Estos resultados, junto con los obtenidos en los injertos de piel de recién nacido trasplantada sobre hospedadores inmunodeficientes, apuntarían a que la respuesta inflamatoria observada podría estar mediada por los propios queratinocitos de la piel, en lugar de por las células inflamatorias reclutadas hacia ella. Posteriormente, a los 30 días los animales presentan ya un estado inflamatorio establecido, formado por componentes característicos de la inmunidad innata, con niveles elevados de citoquinas implicadas en el reclutamiento de granulocitos,

macrófagos (GCSF, GMCSF) y neutrófilos (CXCL1). Además, el incremento observado en: CXCL1, implicada en la curación de heridas y desarrollo tumoral (Arwert, Hoste et al.); TREM-1, potenciador de la respuesta inmune y sobreexpresado en los macrófagos tumorales (Ford and McVicar 2009); y el descenso en los niveles de CXCL9, quimioatrayente de linfocitos T y células NK desde la sangre periférica, con actividad angioestática (Srivastava, Zhu et al.), podrían estar favoreciendo el desarrollo tumoral que se observa en estos animales, como se describe más adelante.

1.5. La población de células madre epidérmicas se encuentra disminuida en la piel de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

Los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ desarrollaron heridas espontáneas en la piel (Fig. 1C) de diversa localización: cabeza, extremidades anteriores (Fig. 15A), área submaxilar, pectoral y axilar (Fig. 15B), zonas laterales en abdomen, área inguinal y extremidades posteriores (Fig. 15C). En general, estas úlceras no cicatrizaban con normalidad, dejando la herida abierta y manteniendo expuesto el tejido subcutáneo a cualquier agente externo del medio (Fig. 15A-E).

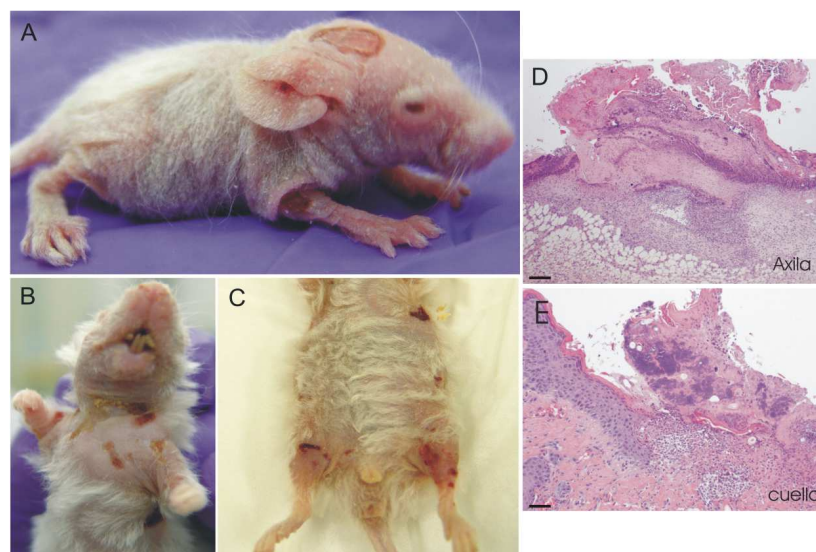


Fig. 15. Desarrollo de heridas espontáneas en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Aspecto de heridas espontáneas de diversa localización desarrolladas en el ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$: parte superior de la cabeza y articulación extremidad delantera (A), múltiples heridas en área del cuello, pectoral y extremidades delanteras (B), heridas en flancos del abdomen y en áreas inguinales de las extremidades trasera (C). D-E) Imágenes microscópicas de cortes histológicos de heridas en la piel de la axila (D) y cuello (E) del ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Barra=100 μ m.

El retraso en la cicatrización de las heridas, unido a otras alteraciones observadas en la epidermis, como la distrofia en los folículos pilosos y la hipertrofia de las glándulas sebáceas (Fig. 3E), podrían indicar que la pérdida simultánea de pRb y p21 en la epidermis estaría alterando la homeostasis de la población de células madre. Por tanto, se decidió estudiar esta

población en la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ utilizando los marcadores de célula madre epidérmica K15 y CD34 (Blanpain and Fuchs 2006). En primer lugar, se caracterizó mediante inmunofluorescencia la expresión de K15, marcador que en condiciones normales se localiza en la región del *bulge* de los folículos pilosos (Lorz, Garcia-Escudero et al. 2010). El resultado mostró una correcta localización folicular de células K15 positivas (K15+) en todos los folículos de las pieles control, y de forma esporádica en algunos folículos de las pieles $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Fig. 16A, B). Cabe destacar, que las pieles $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ presentaban un número considerable de folículos anómalos en los que no se detectaban células K15+ (Fig. 16B'), indicando un posible descenso de la población de células madre.

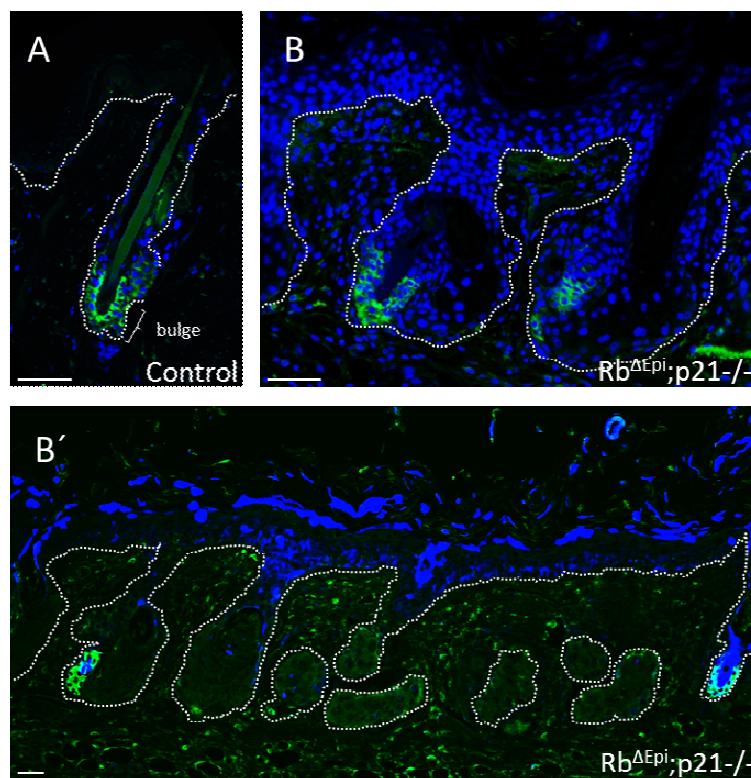


Fig. 16. Expresión y localización de las células madre epidérmicas en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-B') Inmunofluorescencia realizada en secciones de piel de animales adultos frente a K15 en verde y DAPI en azul en los genotipos citados. El corchete delimita el área del bulge (A). Se distingue una disminución en el número de células positivas K15 en los folículos de la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, y en el número de folículos pilosos con una población K15+ en estos animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (B'), a diferencia del animal control (datos no mostrados). La línea de puntos señala el límite dermo-epidérmico. Barra=100μm.

Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que la ausencia de pRb en la epidermis no alteraba la distribución de la población CD34+ (Lorz, Garcia-Escudero et al. 2010). Con objeto de confirmar si la sucesiva pérdida de p21 producía algún efecto en esta subpoblación celular, se analizó la distribución de células CD34+ mediante citometría de flujo a partir de células epidérmicas de piel de animales control, $p21^{-/-}$ y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (ver apartado

15.1 de Materiales y Métodos). Los resultados indicaron un descenso en el porcentaje de células con marcaje positivo para CD34 en las epidermis de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21$ (2,70%) con respecto al control (4,38%) y $p21^{-/-}$ (4,19%) (Fig.17). En su conjunto, estos resultados indican que la deficiencia conjunta de Rb y p21 produce un descenso en la población de células madre epidérmicas.

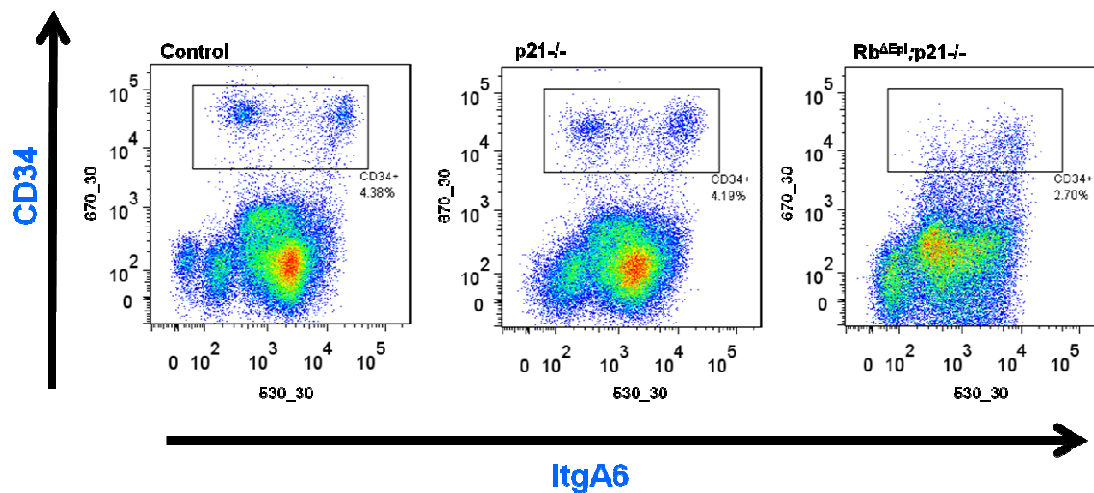


Fig. 17. Análisis por citometría de flujo de las poblaciones de células madre epidérmicas positivas para CD34 en la epidermis de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Aspecto por citometría de las poblaciones de queratinocitos control, $p21^{-/-}$ y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, separados en base a su marcaje empleando marcadores de superficie CD34 e Integrina $\alpha 6$ (Itg A6). Las células CD34 positivas son las situadas dentro del rectángulo dibujado en el panel correspondiente. Nótese la disminución de células con marcaje positivo CD34 en las pieles de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, con respecto a sus controles. Base de la fluorescencia para CD34, 670/30 nm, y para ItgA6, 530_30.

En su conjunto, estos resultados indican que la pérdida simultánea de pRb y $p21$ en la epidermis conduce a un agravamiento del fenotipo observado en los animales $pRb^{\Delta Epi}$ produciendo alteraciones severas en la piel, que afectan a los procesos de proliferación y diferenciación de las células, soportando una disminución en la población de células madre epidérmicas y el desarrollo de un proceso inflamatorio agudo en la piel.

2.- La eliminación de Retinoblastoma en la epidermis de ratones deficientes en p21, conduce al desarrollo de tumores espontáneos.

2.1. Desarrollo de tumores espontáneos en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

Estudios previos de nuestro grupo demostraron que los animales deficientes en pRb en epidermis no desarrollan tumores espontáneos (Ruiz, Santos et al. 2004). Sin embargo, bajo tratamientos de carcinogénesis química desarrollan papilomas, aunque en menor número y tamaño que los controles como consecuencia del aumento de la apoptosis promovida por la inducción de p53 (Ruiz, Santos et al. 2005). No obstante, estos papilomas presentan una mayor tasa de malignización debido a una presión selectiva que induce la pérdida prematura de p53 favoreciendo la conversión a CCE (Ruiz, Santos et al. 2005). Por otro lado, se ha otorgado a p21 una actividad como supresor tumoral en varios sistemas, donde se ha demostrado que su deficiencia provoca el desarrollo de tumores espontáneos a edades tardías (Martin-Caballero, Flores et al. 2001), e incrementa la susceptibilidad tumoral en modelos animales sometidos a tratamientos de carcinogénesis química (Missero, Di Cunto et al. 1996, Philipp, Vo et al. 1999, Topley, Okuyama et al. 1999, Weinberg, Fernandez-Salas et al. 1999).

Estos antecedentes, unidos al deterioro y la baja supervivencia observada en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, planteó la hipótesis de que la eliminación simultánea de *Rb1* y *Cdkn1a* en los epitelios estratificados podría dar lugar a la aparición de tumores, lo que contribuiría a la menor supervivencia de estos animales. Para comprobarlo, se realizó la necropsia completa de un grupo representativo de animales de cada genotipo, examinando secciones de varios tejidos. Las necropsias mostraron que los ratones control y $pRb^{\Delta Epi}$ (n=50 por genotipo) no desarrollaron tumores espontáneos, de acuerdo con las observaciones previas (Ruiz, Santos et al. 2004), mientras que los ratones $p21^{-/-}$ desarrollaron tumores con una incidencia muy baja y a edades avanzadas (4/44 ratones entre las 48 y 52 semanas de edad), coincidiendo con lo descrito anteriormente (Martin-Caballero, Flores et al. 2001). Por el contrario, los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ desarrollaron tumores espontáneos de diversa localización con una incidencia muy elevada (39/44 ratones, incluidos 5 ratones sacrificados entre 2-5 semanas de edad que no mostraron lesiones tumorales). La mayor parte de los tumores fueron de origen epitelial, con mayor frecuencia en lengua (47,7%), piel y labio (22,7%) (Tabla 3).

Tabla 3. Clasificación de las lesiones tumorales de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$: incidencia, localización y edad del animal.

Tipo de tumor	Localización	Incidencia (%)*	Edad**
CCE	Labio	10/44 (22,7%)	2
CCE	Lengua	21/44 (47,7%)	4
CCE	Epitelio Oral	3/44 (6,8%)	4
CCE, CCA y CIS	Piel	10/44 (22,7%)	4, 6 y 12

*Porcentaje de ratones que muestran el tipo de tumor señalado; **Edad en semanas a la cual el tumor fue observado por primera vez; CCE: Carcinoma de Células Escamosas; CIS: Carcinoma in situ; CCA: Carcinoma Celular Adenoescamoso

La mayoría de las lesiones tumorales desarrolladas no eran visibles macroscópicamente, y se identificaron mediante el análisis histopatológico de muestras procedentes de diversos tejidos como piel (Fig. 18A, B), epitelio oral (Fig. 18C), labio (Fig. 18D) o epitelio dorsal (Fig. 18E) y ventral de lengua (Fig. 18E'). En el caso de lesiones en la piel, se detectó frecuentemente la aparición de tumores en áreas contiguas a zonas con heridas (Fig. 18B).

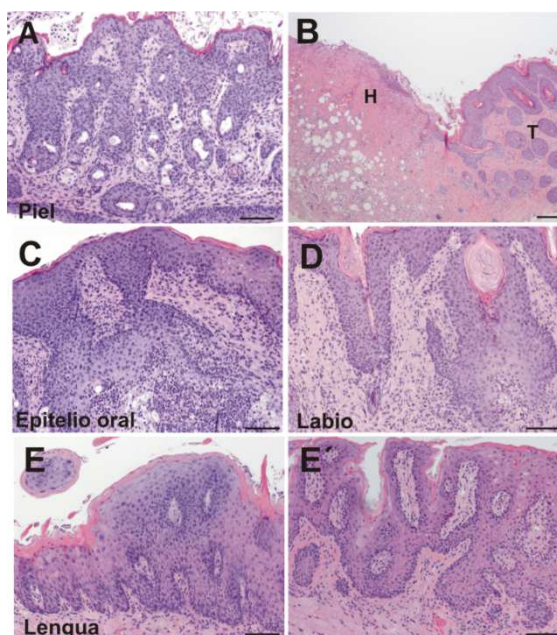


Fig. 18. Hematoxilinas-eosinas representativas de lesiones tumorales epiteliales de ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Carcinoma de piel (A). Carcinoma de piel adyacente a una herida (B), donde se señala la herida (H) y la zona tumoral (T). Carcinomas escamosos en epitelio oral (C), labio (D) epitelio dorsal de lengua (E) y epitelio ventral de lengua (E').

La cinética del desarrollo tumoral en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, mostró que los tumores surgían a edades muy tempranas (edad mínima de detección de 2 semanas), observando que el 50% de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ presentaban lesiones tumorales a las 15 semanas, y más del 90% a las 40 semanas de edad (Fig. 19).

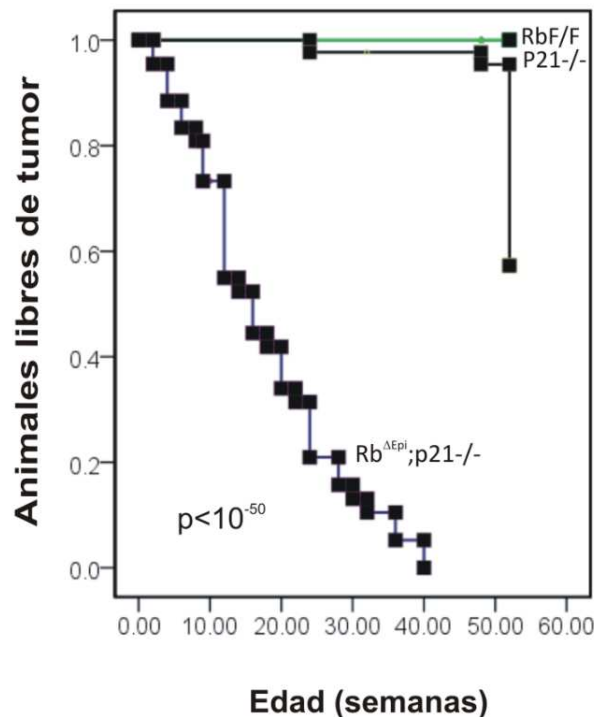


Figura 19. Cinética del desarrollo tumoral de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Curva Kaplan Meier mostrando el desarrollo de tumores de los ratones de los cuatro genotipos. El Valor p se obtuvo por test Log Rank.

2.2. Desarrollo de tumores espontáneos en trasplantes de piel de ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ recién nacidos.

Por otra parte, se quiso determinar si la mera delección de *Rb1* y *Cdkn1a* en los epitelios estratificados es suficiente para desencadenar la tumorigénesis fuera de un contexto inmunocompetente. Para ello, se estudió la evolución de los trasplantes de piel de recién nacido de los cuatro genotipos sobre animales inmunodeficientes NOD/SCID durante tres meses. Se observó que únicamente los trasplantes de piel $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ generaron lesiones en la zona del injerto trasplantado con una incidencia elevada (3/5 ratones). El análisis histopatológico confirmó que estas lesiones correspondían a lesiones papilomatosas y CCEs (Fig. 20B-B') caracterizados por un alto grado de diferenciación y una elevada tasa proliferativa (Fig. 20C). El resto de los trasplantes de piel de ratones recién nacidos control, $pRb^{\Delta Epi}$ y $p21^{-/-}$, no desarrollaron ningún tipo de lesión (Fig. 20A).

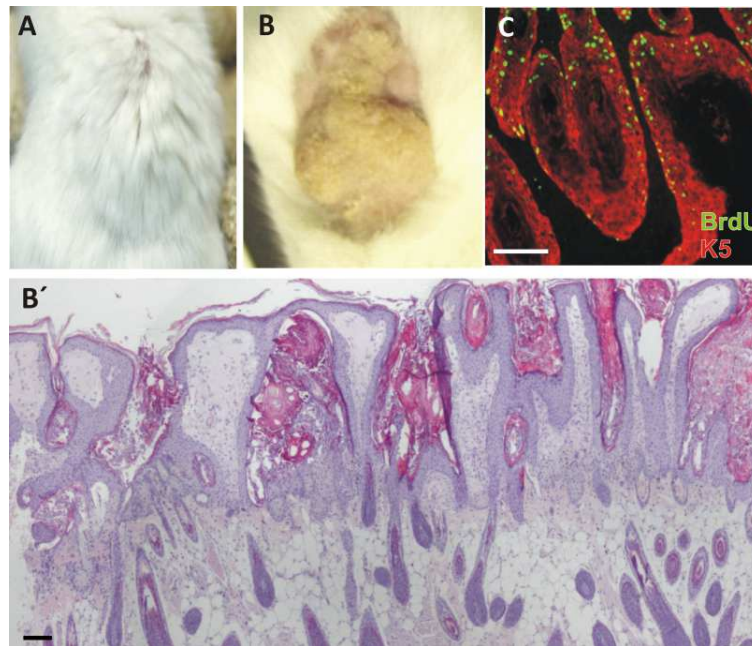


Fig. 20. Los trasplantes de piel de ratón recién nacido $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ sobre NOD/SCID generaron lesiones tumorales. Apariencia macroscópica (A, B) e histología (B') del trasplante de piel de recién nacido $pRb^{\Delta Epi}$ (A) y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (B, B'). C) imagen mostrando por inmunofluorescencia la incorporación de BrdU (en verde) en células positivas para queratina K5 (en rojo) en los injertos de piel procedentes de ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Barras=200 μ m.

2.3. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo tumoral de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

2.3.1. Perfil de expresión génica de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

Con el objeto de dilucidar los mecanismos moleculares que subyacen al fenotipo de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y en particular la susceptibilidad al desarrollo de tumores espontáneos, se llevaron a cabo análisis comparativos de expresión génica a partir del ARN total aislado de la piel de animales recién nacidos control y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. El estudio de la expresión génica diferencial entre el animal control y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se realizó aplicando el análisis estadístico *Significance Analysis of Microarrays (SAM)* ($p < 0,01$, aumento de expresión > 2). En comparación con una piel control, la pérdida simultánea de los genes *Rb1* y *Cdkn1a* en los epitelios estratificados conduce a una expresión diferencial de 2510 genes/sondas, de los cuales 1445 muestran una expresión aumentada y 1065 una expresión disminuida (Fig. 21A y Anexos 1 y 2). Para obtener información acerca de los procesos biológicos en los que estaban involucrados los genes desregulados, se analizó el enriquecimiento funcional utilizando la base de datos *Gene Ontology (GOBP)* (Dennis, Sherman et al. 2003). El análisis mostró que los genes con una expresión disminuida estaban implicados predominantemente en los procesos de transporte de la cadena de electrones, óxido-reducción, generación de precursores metabólicos y energía.

Las funciones representadas por los genes con expresión aumentada estaban relacionadas predominantemente con adhesión celular, vías de señalización mediada por citoquinas, desarrollo epitelial y proliferación celular (Fig. 21B), en consonancia con lo observado en el fenotipo del ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

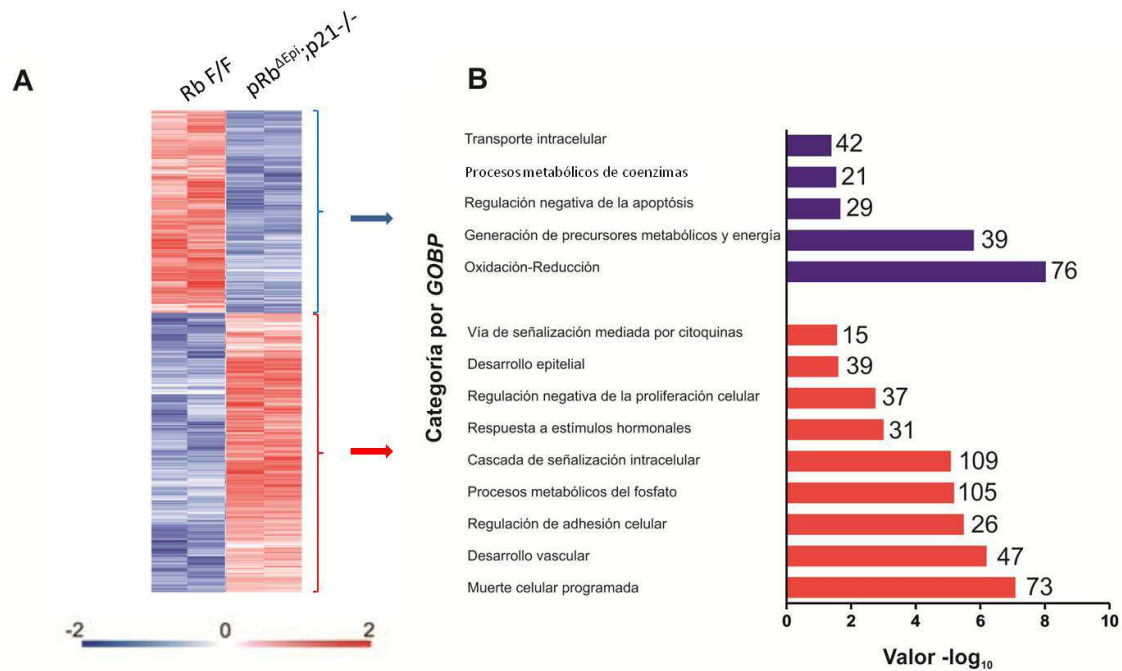


Fig. 21. Genes expresados diferencialmente en la piel del ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A) Patrón de expresión génica diferencial entre las pieles de recién control y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Los niveles de expresión se representan normalizados en una escala del -2 (azul) al 2 (rojo). B) Gene Ontology de los genes seleccionados en las muestras de piel $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. El color rojo indica genes con expresión aumentada y el color azul expresión génica disminuida. Junto a cada barra se indica el número de genes de cada categoría.

Estos análisis revelaron que un gran número de genes con expresión desregulada afectaban a vías específicas y relevantes de la homeostasis y tumorigénesis epidérmica, como la vía de *Hedgehog* (*Shh*, *Ptch1*, *Smo*, *Sfrp1*), *Notch* (*Psen1*, *Hey2*, *Hey1*, *Notch1*) y *Wnt/Sox* (*Wnt11*, *Wnt5a*, *Wnt2*, *Sox13*, *Sox2*, *Sox21*, *Sox5*, *Lgr5*, *Ltbp3*, *Msx2*, *Ctnnb1*, *Myc*, *Ovol1*) (Arwert, Hoste et al. , Toftgard 2000, Blanpain and Fuchs 2006, Lorz, Segrelles et al. 2009). En base a estos datos, se procedió a validar estos resultados analizando la expresión de algunos de estos genes que actúan como activadores o inhibidores de estas rutas, mediante qRT-PCR (Fig. 22). El resultado mostró, que los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ presentaban un aumento significativo de expresión de los genes *Ptch1* ($p < 0,001$) y *Smo* ($p < 0,01$) (Fig. 22A, B) y de los genes *Gli1* ($p < 0,01$) (Fig. 22C) y *Hes1* ($p < 0,005$) (Fig. 22D), indicativo de la activación de las vías *Hedgehog* y *Notch* en las epidermis.

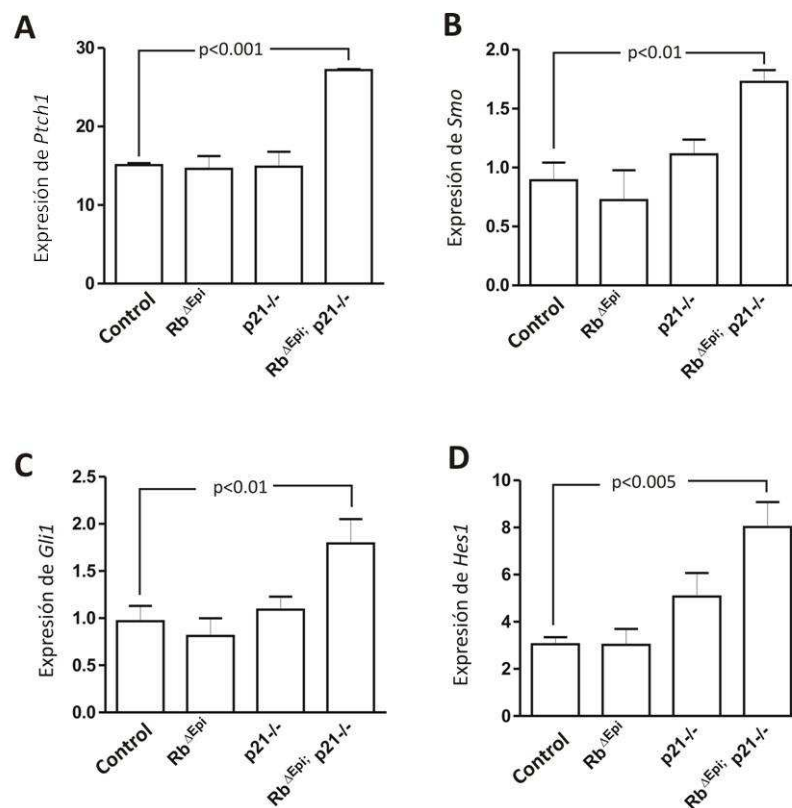


Fig. 22. Actividad en la señalización de las vías Shh y Notch en la piel de los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. A-D) Análisis cuantitativo por qRT-PCR de los genes citados, en la piel de recién nacido de ratones de cada genotipo. Cada barra procede de entre tres y cinco extractos de piel independientes. En cada caso, se representan sus valores promedios con respecto al gen de referencia (GusB). El valor p se obtuvo por ANOVA de una vía y la comparación específica mediante el test Bonferroni.

Además, se analizó la funcionalidad relativa de la vía de Wnt utilizando genes que habitualmente se encuentran regulados por ellas. En concreto, se analizaron *Lgr5*, *Myc*, *Ovol1* y *Axin2* (Fig. 23A) mediante qRT-PCR, y los niveles de β-Catenina activa a partir de extractos de piel por *western blot*, (Fig. 23B). En todos los casos se detectó un incremento de la expresión de estos genes en la piel de los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. En su conjunto, estos resultados indicarían una activación de la vía de Wnt/Sox relacionada con el desarrollo tumoral en varios sistemas, incluyendo piel.

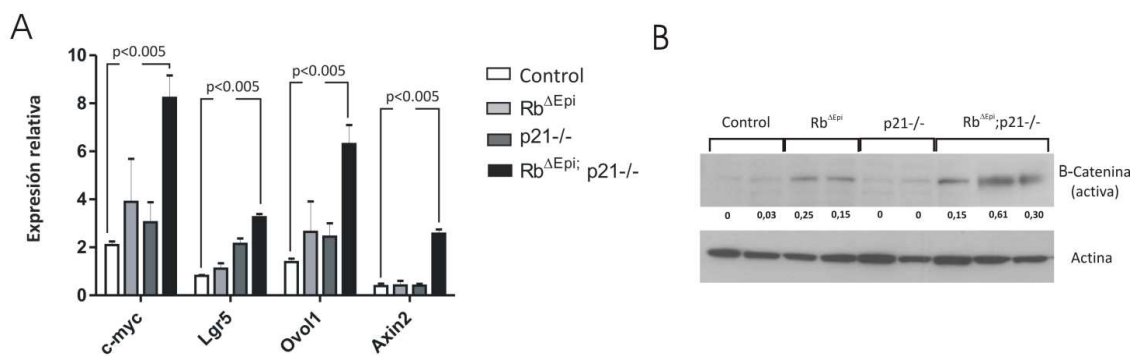


Fig. 23. Análisis de la funcionalidad de las vías de Wnt en la piel de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A) Análisis cuantitativo por qRT-PCR de los genes citados en la piel de los ratones recién nacidos de cada genotipo. Cada barra procede de una mezcla de entre tres y cinco extractos de piel independientes, representados con sus valores promedios con respecto al gen de referencia (*GusB*). El valor *p* se obtuvo por ANOVA de una vía y la comparación específica del test Bonferroni. B) Análisis por western blot de β -Catenina activa en extractos proteicos procedentes de piel de ratón recién nacido de cada genotipo. Cada línea representa una muestra de ratón independiente. El número que figura debajo de cada banda se corresponde con el valor densitométrico normalizado acorde a su correspondiente valor de Actina.

2.3.2. Similitud entre los genes desregulados en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, $p53^{\Delta Epi}$ y $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$.

Con objeto de completar el análisis funcional de los genes diferencialmente expresados entre la piel de un ratón control y un ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, se compararon los genes expresados diferencialmente con información procedente de distintas fuentes empleando la herramienta bioinformática *Gene Set Enrichment Analysis* (GSEA). Se analizaron un total de 4.850 grupos de genes de la colección “c2.cpg.v3.0” (*Chemical and Genetic Perturbations*) incluidas en la base de datos *Molecular Signatures Database* (MSigDB) (ver *Materiales y Métodos* y Anexo 3), y se seleccionaron algunos grupos estadísticamente significativos y relevantes (Tabla 4). El resultado de las comparativas mostró un solapamiento significativo de los genes desregulados en la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ en comparación con lo observado en los modelos animales $p53^{\Delta Epi}$ y $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$ (Tabla 4 y Anexo 3) (Martínez-Cruz, Santos et al. 2009), lo que sugiere un papel relevante de p21 en la señalización dependiente de p53 en epidermis. Además, se encontró un solapamiento significativo con grupos de genes relacionados con la expresión génica dependiente de p53, como son el daño y la reparación del ADN (Tabla 4).

Tabla 4. Resumen del Análisis de Enriquecimiento Génico (GSEA) de los genes desregulados en la piel del ratón Rb^{ΔEpi};p21^{-/-}.

<i>Nombre grupo de genes (N)^a</i>	<i>Descripción (referencia)</i>	<i>Tamaño</i>	<i>NES</i>	<i>FDR Valor q</i>
<i>Martinez_Rb1_And_Tp53_Targets_Up (188)</i>	Genes con expresión aumentada en ratones con deficiencia específica de RB1 y TP53 en piel mediante el sistema Cre-lox (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008).	560	2,60	<0,0001
<i>Martinez_Tp53_Targets_Up (181)</i>	Genes con expresión aumentada en ratones con deficiencia específica de TP53 en piel (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008).	559	2,54	<0,0001
<i>Mcmurray_Tp53_Hras_Cooperation_Response_Up (10)</i>	Genes expresión aumentada que responden sinérgicamente a la combinación de mutantes para TP53 y HRAS en células YAMC (colon) (McMurray, Sampson et al. 2008).	19	1,94	0,001
<i>Brocke_Apoptosis_Reversed_By_Il6 (33)</i>	Cambio en los genes de las células INA-6 (mieloma múltiple) por una adición <i>de novo</i> de IL6, después de 12h de su retirada (Brocke-Heidrich, Kretzschmar et al. 2004).	107	1,70	0,035
<i>Dutta_Apoptosis_Via_Nfkb (10)</i>	Genes Diana de NFκB implicados en la regulación de la muerte celular programada (Dutta, Fan et al. 2006).	26	1,64	0,033
<i>Inga_Tp53_Targets (5)</i>	Genes cuyos promotores contienen elementos de respuesta a TP53 (Inga, Storici et al. 2002).	15	1,60	0,045
<i>Kyng_Dna_Damage_Up (20)</i>	Genes seleccionados por GOBP y con expresión aumentada tras daño en el ADN en líneas celulares procedentes de donantes jóvenes (Kyng, May et al. 2005).	84	1,55	0,090
<i>Reactome_P53_Independent_Dna_Damage_Response (30)</i>	Genes implicados en el punto de control de daño AND en G1/S independiente de p53 (http://www.reactome.org/)	42	-1,71	0.057
<i>Pyeon_Hpv_Positive_Tumors_Up (22)</i>	Genes con expresión disminuida en carcinoma cervical y tumores de cabeza y cuello positivos para HPV comparado a los HPV negativos (Pyeon, Newton et al. 2007).	47	-1,97	0,027
<i>Martinez_Tp53_Targets_Dn (190)</i>	Genes con expresión disminuida en ratones con deficiencia específica de TP53 en piel (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008).	520	-2,83	<0,0001
<i>Martinez_Rb1_And_Tp53_Targets_Dn (223)</i>	Genes con expresión disminuida en ratones con doble deficiencia específica en RB1 y TP53 en epidermis por el sistema Cre-lox (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008).	516	-2,90	<0,0001

N: número de genes enriquecidos. NES: índice de enriquecimiento normalizado: NES>0: enriquecimiento en Rb^{ΔEpi};p21^{-/-} NES<0: enriquecimiento en el control. FDR: tasa de detección falsa. Significativo<0,25. Tamaño: número de genes dentro de cada grupo génico

2.3.3. Factores de transcripción implicados en la regulación génica.

Para determinar qué posibles factores de transcripción están involucrados en la regulación de los genes diferencialmente expresados en las muestras de los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}, se empleó un análisis bioinformático utilizando la herramienta de análisis de enriquecimiento de datos de inmunoprecipitación de cromatina (ChEA) (Lachmann, Xu et al.

2010). Esta herramienta informática engloba información de múltiples publicaciones y datos experimentales que reportan la unión de ciertos factores de transcripción a zonas reguladoras de determinados genes, datadas experimentalmente mediante ChIP-chip, ChIP-Seq o ChIP-MassSpec (ver *Materiales y Métodos*). Este análisis desveló la implicación de los factores de transcripción de la familia E2F y Trp63 en los genes desregulados, afectando tanto a aquellos que presentan una expresión aumentada como disminuida (Fig 24A, B). No obstante, los datos apuntan a que E2F parece estar implicado predominantemente en la regulación de genes con una expresión disminuida (Fig. 24A), mientras que Trp63 parece estar implicado predominantemente en la regulación de genes con una expresión aumentada en las pieles $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Fig. 24B).

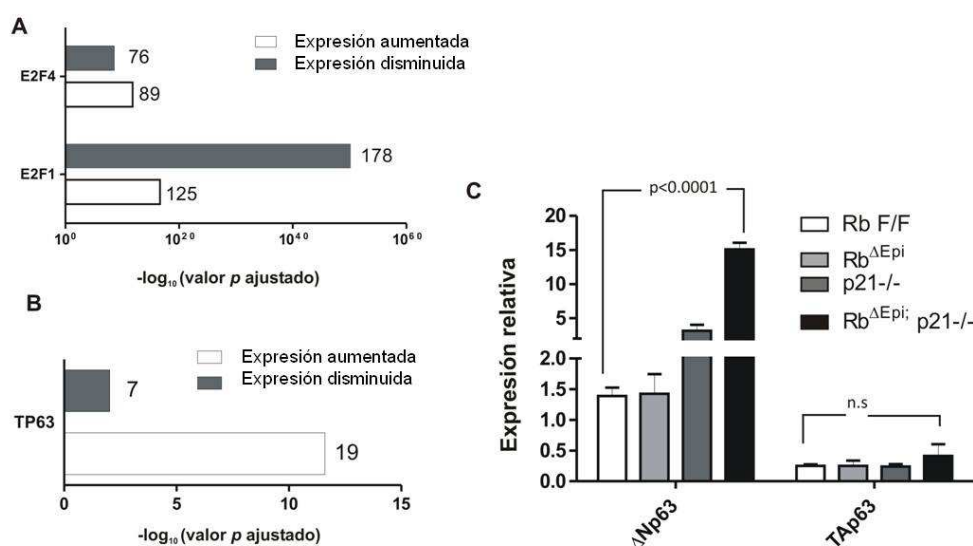


Fig. 24. Elementos de regulación génica en las pieles de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A,B) Resumen de los datos obtenidos por ChEA mostrando la presencia de E2Fs (A) y p63 (B) vinculados a genes cuya regulación está aumentada o disminuida en la piel de ratones recién nacidos $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. C) Análisis cuantitativos por qRT-PCR mostrando la expresión de las isoformas $\Delta Np63$ y $TAp63$ en las muestras de piel de recién nacido de los cuatro genotipos. Los valores por genotipo se representan en promedios. Los valores p se obtuvieron mediante ANOVA de una vía y la comparación específica posterior mediante el test de Bonferroni. El número que aparece junto a cada barra representa el número de genes regulados por cada factor de transcripción.

El gen Trp63 produce, como consecuencia de la utilización de promotores alternativos, dos tipos principales de proteínas TAp63 (*Trans-Activating isoforms*, isoforma activa) y $\Delta Np63$ (isoforma truncada en la posición amino-terminal), de las que por procesamiento diferencial se generan 8-10 isoformas diferentes (Yao and Chen 2012, King, Ha et al. 2013). De forma relevante, TA y $\Delta Np63$ presentan funciones diferentes e incluso opuestas en el desarrollo epidérmico y tumoral (Mills, Zheng et al. 1999, Parsa, Yang et al. 1999, King and Weinberg 2007). El análisis de la expresión de estas isoformas no es fácil ya que los anticuerpos disponibles no son específicos. En consecuencia, la expresión diferencial de las isoformas de

p63 se analizaron mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron que la isoforma $\Delta Np63$, pero no TAp63, presentaba un aumento de expresión significativo en la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, y en menor medida en los animales $p21^{-/-}$ (Fig. 24C).

La base de datos ChEA, empleada para determinar la regulación por factores E2F, contiene solamente datos relativos a E2F1 y E2F4. En consecuencia, de forma análoga a p63, se analizó la expresión de los diversos miembros de la familia de factores de transcripción E2F mediante qRT-PCR. Los resultados mostraron aumento en la expresión de elementos considerados activadores (*E2f1*, *E2f2*), y represores (*E2f4*, *E2f5* y *E2f7*) de la expresión génica (Fig. 25).

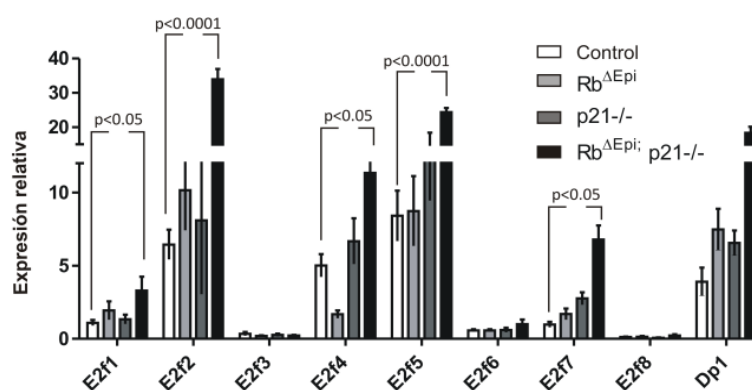


Fig. 25. Expresión génica de los miembros de la familia E2F en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Análisis cuantitativos por qRT-PCR mostrando la expresión de los diferentes miembros de la familia E2F en muestras de piel de recién nacido de los genotipos citados. Los valores por genotipo se representan en promedios. Los valores *p* se obtuvieron mediante ANOVA de una vía y la comparación específica posterior mediante el test de Bonferroni.

2.4. Evidencia de estrés replicativo e inducción de p53 en la epidermis de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

El análisis de expresión génica global mediante GSEA indicó un solapamiento significativo con grupos de genes relacionados con mecanismos de respuesta al daño en el ADN, lo que era indicativo de una posible activación de este mecanismo en la epidermis de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Tabla 4). Para confirmar este hecho, se caracterizó el mecanismo de respuesta al daño en el ADN en las pieles de ratón de los cuatro genotipos mediante detección por inmunohistoquímica de la histona H2AX en su forma fosforilada (γ H2AX), identificada como un marcador temprano de la respuesta a daño en el ADN (Fragkos, Jurvansuu et al. 2009). El resultado reveló que la piel de los ratones control, $p21^{-/-}$ y $pRb^{\Delta Epi}$ a 30 días no mostraba señales positivas para γ H2AX (Fig. 26A, B, C). Sin embargo, en las pieles de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se observaba una tinción positiva para γ H2AX (Fig. 26D). Este mismo

patrón se observaba tanto en la piel de animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ a 10 días (Fig. 26D') como en los injertos de piel de recién nacido $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ trasplantados (Fig. 26D''). En todos los casos la $\gamma H2AX$ se localizaba principalmente en los queratinocitos situados en las capas más externas de la epidermis. Simultáneamente, mediante inmunofluorescencia, se detectó que las mismas células que expresaban $\gamma H2AX$ co-expresaban el supresor tumoral de p53 (Fig. 26E) indicando una posible activación de los mecanismos de reparación del daño. El análisis bioquímico, mediante *western blots* de extractos de proteína de la piel de los cuatro genotipos, confirmó el aumento de los niveles de $\gamma H2AX$ observado en las pieles $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Fig. 26F).

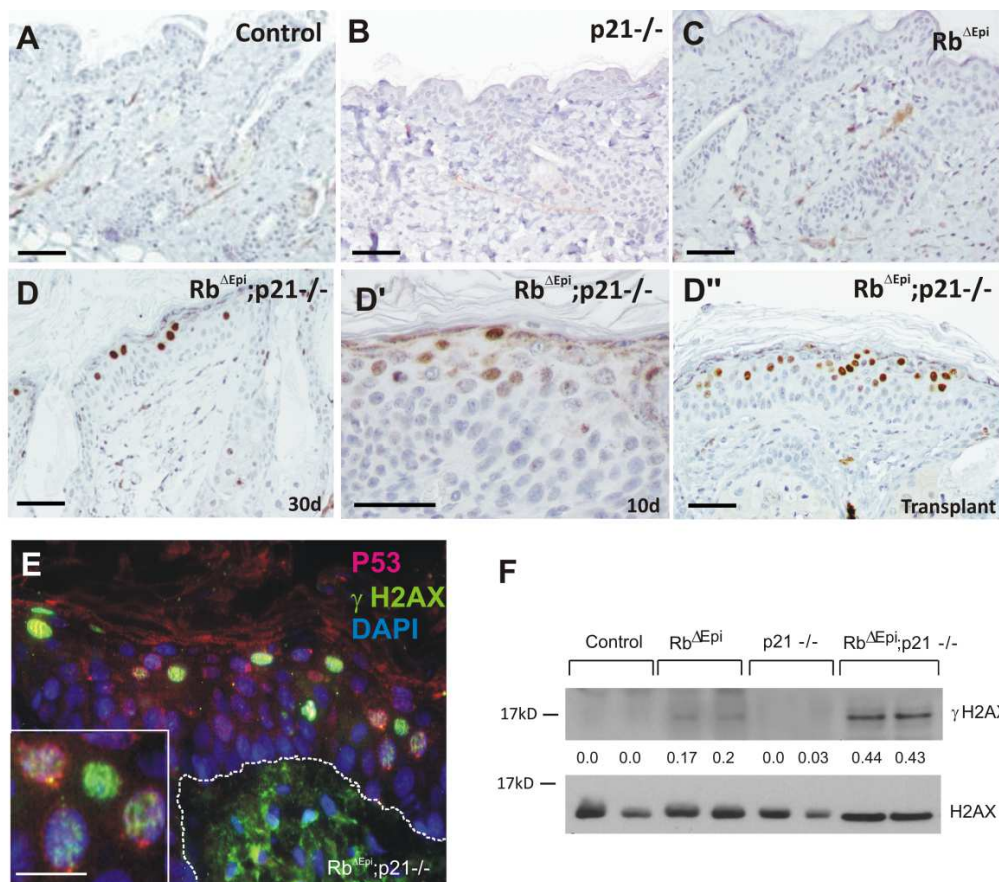


Fig. 26. Detección de daño en el ADN en la epidermis de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-D'') Imágenes representativas de la detección por inmunohistoquímica de la histona $\gamma H2AX$ en la epidermis de ratones control (A), $p21^{-/-}$ (B), $Rb^{\Delta Epi}$ (C) y $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (D-D'') de 30 días (A, B, C, D), de 10 días (D') y trasplantes de recién nacido $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ sobre NOD/SCID (D''). Barra=50 μ m. E) Doble inmunofluorescencia mostrando la co-expresión de p53 (rojo) e histona $\gamma H2AX$ (verde) en la epidermis de ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. El DAPI se muestra en azul marcando los núcleos. Barra=10 μ m. La línea discontinua delimita los bordes dermo-epidérmicos. El recuadro muestra una magnificación mayor de los núcleos que contienen la doble tinción. F) Análisis por western blot mostrando la expresión de $\gamma H2AX$ en extractos de piel de ratones de los genotipos citados. La histona H2AX total se utilizó como control de carga. El número que figura debajo de cada línea indica el valor densitométrico de cada banda normalizada de acuerdo a su valor correspondiente de H2AX.

La señal de $\gamma H2AX$ detectada en las pieles $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ abarcaba todo el núcleo en la mayoría de las células (Fig. 26). Este patrón de expresión es frecuente en tejidos expuestos a

un estrés replicativo y diferente de la tinción en algunos focos dispersos evidente en células sometidas a un daño genotóxico agudo (Toledo, Murga et al. , Cimprich and Cortez 2008). Esto, junto con el hecho de que la γ H2AX se detecte predominante en las células suprabasales de la epidermis de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, apoyaría la hipótesis de que en estos animales la ausencia simultánea pRb y p21 en los queratinocitos provocaría su entrada en un programa de diferenciación sin haber detenido su proliferación, originando un estrés replicativo que produciría una acumulación de daño en el ADN.

Para confirmar si el daño era una consecuencia del estrés replicativo, se analizaron los niveles de proteínas de la vía ATR-Chk1, implicada en la respuesta a este tipo de daño (Cimprich and Cortez 2008, Lopez-Contreras and Fernandez-Capetillo 2010). El análisis por *western blot* a partir de extractos de piel de los cuatro genotipos en estudio mostró niveles significativamente elevados de: p53 (Fig.27G, G'), ATR (Fig. 27G, G''), Chk1-P (Fig. 27G, G''') y Chk1 (Fig. 27G, G''') indicando una activación de la vía.

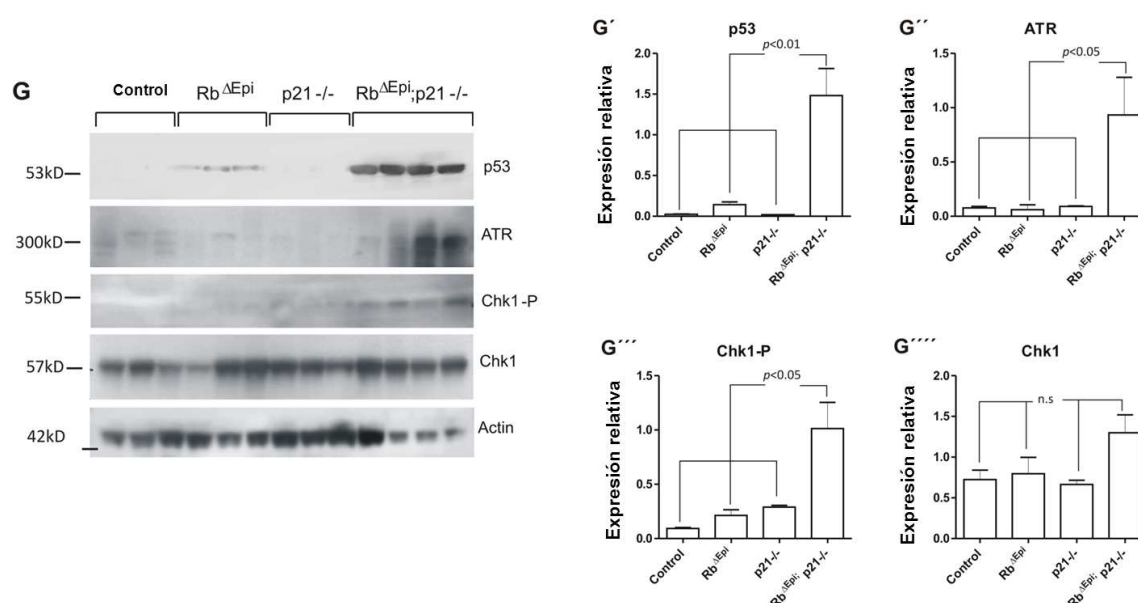


Fig. 27. El eje molecular del mecanismo de reparación de daño en el ADN está activado en la piel de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. G) Análisis por western blot de los elementos de respuesta a daño en el ADN en la epidermis de los ratones de los cuatro genotipos citados. Cada línea corresponde a una muestra independiente. G'-G''') Análisis densitométrico de las diferentes bandas y normalizadas de acuerdo a su valor correspondiente de Actina.

2.5. Los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ no muestran signos de apoptosis.

Debido a los resultados anteriores quisimos comprobar si el estrés replicativo observado en las células epidérmicas, como consecuencia de ausencia de pRb y p21, podría estar conduciendo en último término a su muerte. Para comprobarlo se evaluó en primer lugar la muerte por apoptosis. Para ello, se analizó la expresión de p53, por inmunohistoquímica, en

piel (Fig. 27G, G' y 28A) y en lesiones tumorales (Fig. 28B) de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Sin embargo, pese a la inducción de p53 observada en ambos casos, no se detectó Caspasa 3 activa ni en la piel (Fig. 28A', C), ni en las lesiones tumorales (Fig. 28B'), de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, así como tampoco se detectó activación de Parp (Fig. 28C), que confirmasen un proceso apoptótico.

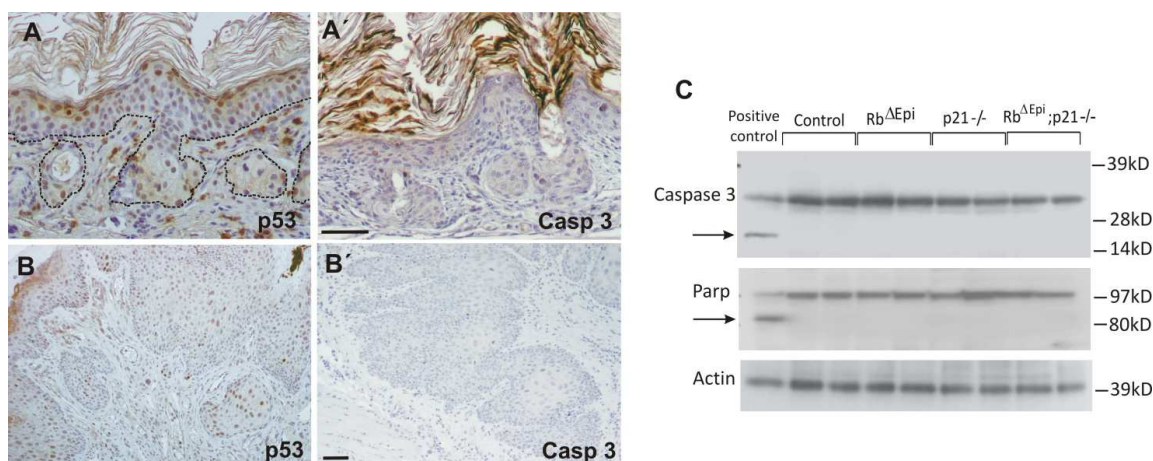


Fig. 28. Los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ no manifiestan signos de apoptosis. A-B') Ejemplos de detección por inmunohistoquímica de p53, en piel (A) o lesiones tumorales (B) de $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, y Caspasa 3 activa, en piel (A') o en lesiones tumorales (B'). Barras=50 μ m. C) Análisis por western blot de Caspasa 3 activa y Parp en extractos proteicos de piel de ratón adulto de los genotipos citados. Las líneas situadas a la derecha del panel indican el peso molecular en kDa. La flecha señala el "control positivo" perteneciente a un extracto proteico de queratinocitos orales de ratón de la cepa FVB silvestre, tratados con una droga inductora de apoptosis. Las flechas a la izquierda señalan los fragmentos de Caspasa 3 activa y Parp. Se utilizó Actina como proteína normalizadora de la carga.

Las células dañadas por estrés replicativo son eliminadas predominantemente por un sistema alternativo de muerte distinto de la apoptosis, denominado "catástrofe mitótica". Este mecanismo de muerte celular es el resultado de una prematura o inadecuada entrada en mitosis de las células que genera cromosomas sin replicar en esta fase del ciclo celular (Vakifahmetoglu, Olsson et al. 2008). En base a esto, analizamos la presencia de mitosis aberrantes y catástrofes mitóticas en secciones de piel de 5-10 animales por genotipo. Únicamente encontramos estas aberraciones en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, detectando mitosis aberrantes y catástrofes mitóticas en zonas no tumorales de la epidermis (Fig. 29A-A'' y C, señaladas por flechas). Estas mitosis aberrantes se detectaban también con frecuencia en los tumores (Fig. 29B). La Fig. 29C muestra la cuantificación de estas aberraciones por mm de epidermis en relación al número total de mitosis. Los datos confirmaron el aumento relevante de estas aberraciones mitóticas en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

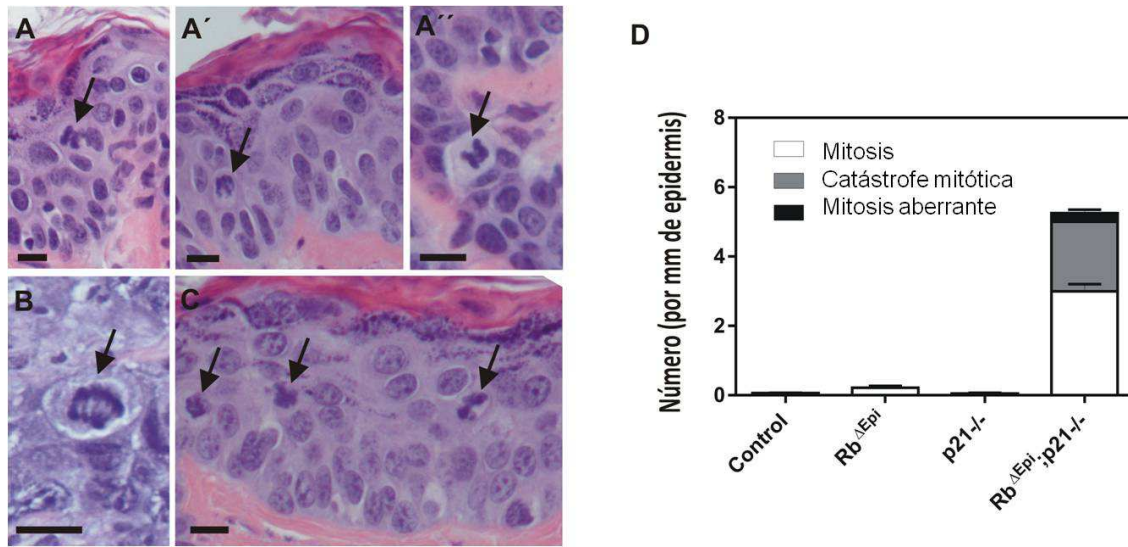


Fig. 29. Las células epidérmicas dañadas de las pieles $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ son eliminadas por catástrofe mitótica. A-A''') Ejemplos de mitosis aberrantes (marcadas con flechas) observadas en piel no tumoral del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. B) Ejemplo de mitosis aberrantes en tumores espontáneos del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. C) Ejemplo de catástrofes mitóticas (señaladas con flechas) observadas en piel no tumoral del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Barras=10 μ m. D) Resumen de mitosis normales, aberrantes y catástrofes mitóticas en la epidermis de los cuatro genotipos citados. Los datos proceden del análisis de secciones de piel de entre cinco y diez ratones de cada genotipo y son representadas como el promedio de mitosis aberrantes y catástrofes mitóticas por mm de epidermis.

En su conjunto, estos resultados indican que la pérdida de simultánea pRb y $p21$ en la epidermis, produce una desregulación génica que afecta a vías de señalización relacionadas con la homeostasis y la tumorigénesis epitelial. Además, ocasiona un aumento de células con daño en el ADN debido al estrés replicativo que se produce. Estas alteraciones, unidas a la inflamación detectada en estos animales, podrían explicar el desarrollo de los tumores espontáneos observados.

3.- Los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ representan un modelo para el estudio de los tumores orales.

Los carcinomas orales, presentan una elevada prevalencia con más de 6.000 casos nuevos diagnosticados en España en 2012, estimándose un incremento del 21% para el 2020. Más del 90% de estos tumores son CCEs (Globocan 2012). Sin embargo, a pesar de los últimos avances en cuanto a la terapia de esta enfermedad la supervivencia global de los pacientes con CECyC es todavía baja. Actualmente, existen pocos modelos animales que recapitulen el desarrollo de esta patología por tanto, la posibilidad de contar con un modelo de ratón de desarrollo de CCEs orales se convierte en una herramienta muy útil para la identificación de posibles dianas terapéuticas.

3.2. Los genes desregulados en las pieles de ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ muestran similitudes con el transcriptoma de CECyC humano.

El desarrollo de CCEs observado en los tejidos orales de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ junto con los datos obtenidos en el análisis por GSEA, en los que se observaba un enriquecimiento significativo de los genes desregulados en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ con datos de expresión génica procedentes de diversos estudios realizados a partir de CECyC humanos (Tabla 4, Anexo 3 y Anexo 4), planteó la posibilidad de validar a los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ como un posible modelo de carcinomas orales. Para ello, se compararon los genes con expresión aumentada en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, con firmas de CECyC obtenidas en diversos estudios genómicos en los que se compara tejido tumoral frente a tejido normal, depositadas en la base *Oncomine* (Rhodes, Yu et al. 2004, Rhodes, Kalyana-Sundaram et al. 2007). La comparativa se realizó utilizando el test de Fisher's considerando un Odds ratio $>1,5$ y un valor $p \leq 0,01$. El resultado reveló un solapamiento significativo entre los ARNm con expresión aumentada en las epidermis de ratón recién nacido $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los ARNm homólogos con expresión aumentada presentes en los estudios de *Oncomine* (Tabla 5). Estos resultados indicarían que los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ podrían representar un modelo para el estudio de los carcinomas orales humanos.

Tabla 5. Solapamiento entre los genes con expresión aumentada en la piel de recién nacido del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y en CECyC humanos. La tabla muestra el número de genes que solapan significativamente entre los genes con expresión aumentada en la piel de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y CECyC humanos, donde se compara tejido tumoral frente a tejido normal.

Referencia del estudio	Criterio: tumor vs tejido normal	Número de genes solapantes	Valor p
(Pyeon, Newton et al. 2007)	Carcinoma de lengua vs normal	155	9,03E-15
(Giordano, Au et al. 2006)	Carcinoma papilar de la glándula tiroides variante de célula alta vs normal	133	1,48E-11
(Giordano, Au et al. 2006)	Carcinoma papilar de la glándula tiroides vs normal	133	1,48E-11
(Ginos, Page et al. 2004)	Carcinoma celular escamoso de cabeza y cuello vs normal	125	3,70E-09
(Giordano, Au et al. 2006)	Carcinoma papilar de la glándula tiroides variante folicular vs normal	121	4,58E-08
(Pyeon, Newton et al. 2007)	Carcinoma orofaríngeo vs normal	131	8,74E-08
(Giordano, Au et al. 2006)	Carcinoma (Anaplásico) indiferenciado de la glándula tiroides vs normal	116	8,40E-07
(Pyeon, Newton et al. 2007)	Carcinoma del suelo de boca vs normal	124	3,56E-06
(Estilo, P et al. 2009)	Carcinoma celular escamoso de lengua vs normal	92	1,25E-05
(Pyeon, Newton et al. 2007)	Carcinoma de cavidad oral vs normal	121	1,51E-05
(Talbot, P et al. 2004)	Carcinoma celular escamoso de lengua vs normal	91	2,16E-05
(He, Jazdzewski et al. 2005)	Carcinoma papilar de glándula tiroidea vs normal	119	3,76E-05
(Frierson, El-Naggar et al. 2002)	Carcinoma cístico Adenoide de glándula salivar vs normal	89	5,73E-05
(Ye, Yu et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua vs normal	117	9,03E-05
(Sengupta, den Boon et al. 2006)	Carcinoma nasofaríngeo vs normal	113	4,61E-04
(Schlingemann, Habtemichael et al. 2005)	Carcinoma celular escamoso hipofaríngeo vs normal	102	6,85E-04
(Giordano, Au et al. 2006)	Adenoma folicular de la glándula tiroides vs normal	16	0,003

3.3. Evidencias de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ como modelo de CECyC de buen pronóstico.

El análisis de los datos obtenidos en la comparativa con *Oncomine* permitieron obtener una firma de genes con expresión aumentada común a la epidermis del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y al menos 4 de los 7 estudios de CECyC humanos seleccionados de la base de *Oncomine* (Tabla 5 y Fig. 35).

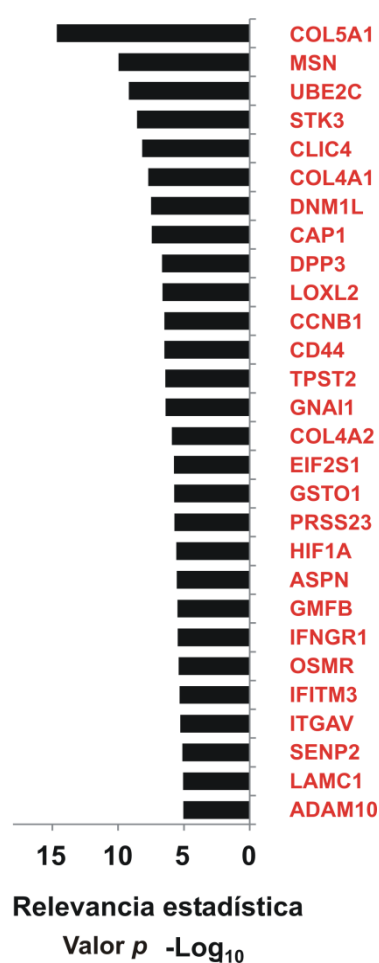


Fig. 35. Firma génica común humana-múrida.

La comparativa con *Oncomine* también mostró un solapamiento significativo entre los genes con expresión aumentada en el ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los genes que aparecen con una expresión disminuida en tumores orales presentes en estudios de *Oncomine* caracterizados por: estar en fase y grado avanzado (Tabla 6 grupo A y grupo B), ser de peor pronóstico clínico o presentar metástasis (Tabla 6 grupo C), en la comparación entre metástasis y tumores primarios (Tabla 6 grupo D).

Tabla 6. Solapamiento entre los genes con expresión aumentada en piel del ratón recién nacido $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los genes con expresión disminuida en CECyC humano. La tabla muestra el número de genes que solapan significativamente entre los genes con expresión aumentada en la piel del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los genes con expresión disminuida en CECyC humanos, según la fase del tumor (Grupo A), el grado (Grupo B), el pronóstico clínico (Grupo C), o la presencia de metástasis comparadas con tumores primarios (Grupo D).

Grupo A			
Referencia del estudio	Criterio: fase	Nº de genes solapantes	Valor p
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso orofaríngeo–fase avanzada	164	6,07E-18
Bittner Thyroid (sin publicar)	Carcinoma papilar de glándula tiroides-fase avanzada. Nódulos afectados.	140	3,82E-10
(Sengupta, den Boon et al. 2006)	Carcinoma nasofaríngeo-fase avanzada. Nódulos afectados.	135	8,56E-09
(Ye, Yu et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua-fase avanzada. Nódulos afectados.	129	2,64E-07
(O'Donnell, Kupferman et al. 2005)	Carcinoma celular escamoso de lengua-fase avanzada. Nódulos afectados.	115	1,46E-06
Bittner Thyroid (sin publicar)	Carcinoma papilar de la glándula del tiroides-fase avanzada	116	1,38E-04
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de cavidad oral-fase avanzada	114	3,12E-04
(Slebos, Yi et al. 2006)	Carcinoma celular escamoso orofaríngeo-fase avanzada	107	0,004
(Slebos, Yi et al. 2006)	Carcinoma celular escamoso laríngeo-fase avanzada	59	0,004
(Toruner, Ulger et al. 2004)	Carcinoma celular escamoso de cavidad oral-fase avanzada. Nódulos afectados.	73	0,006
Grupo B			
Referencia del estudio	Criterio: grado tumoral	Nº de genes solapantes	Valor p
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua-alto grado	184	5,37E-26
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso orofaríngeo- alto grado	151	1,87E-13
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso hipofaríngeo-alto grado	130	1,53E-07
(Ginos, Page et al. 2004)	Carcinoma celular escamosos de cabeza y cuello-alto grado	117	4,79E-07
(Slebos, Yi et al. 2006)	Carcinoma celular escamoso laríngeo-alto grado	68	4,61E-05
(Slebos, Yi et al. 2006)	Carcinoma celular escamoso de cavidad oral	118	5,86E-05
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de cavidad oral	114	3,12E-04

Grupo C			
Referencia del estudio	Criterio: pronóstico clínico	Nº de genes solapantes	Valor <i>p</i>
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua- muerte a los 5 años	155	9,03E-15
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua-evento metastásico a los 5 años	148	1,66E-12
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua-muerte a los 3 años	133	2,79E-08
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua-evento metastásico a los 3 años	126	1,29E-06
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso orofaríngeo-evento metastásico a los 5 años	123	5,81E-06
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso orofaríngeo-evento metastásico a los 3 años	122	9,41E-06
(Cromer, Carles et al. 2004)	Carcinoma celular escamosos de cabeza y cuello-recurrencia a los 5 años	49	3,77E-04
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso hipofaríngeo-muerte a los 3 años	113	4,61E-04
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso hipofaríngeo-evento metastásico a 1 año	113	4,61E-04
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso de lengua-evento metastásico a 1 año	62	0,001
(Cromer, Carles et al. 2004)	Carcinoma celular escamosos de cabeza y cuello-evento metastásico a los 5 años	47	0,001
(Rickman, Millon et al. 2008)	Carcinoma celular escamoso hipofaríngeo-muerte a 1 año	109	0,002
(Cromer, Carles et al. 2004)	Carcinoma celular escamosos de cabeza y cuello-evento metastásico a los 3 años	13	0,006
Grupo D			
Referencia del estudio	Criterio: metástasis vs tumor primario	Nº de genes solapantes	Valor <i>p</i>
(Jain, Watson et al. 2004)	Cáncer de cabeza y cuello-Metástasis	15	7,81E-04
(O'Donnell, Kupferman et al. 2005)	Cáncer de cabeza y cuello-Metástasis	100	0,001

El hecho de que en los tumores más agresivos se observe una disminución en la expresión de los genes que aparecen con expresión aumentada en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, indicaría que estos animales podrían representar un modelo útil para el estudio de los tumores orales de buen pronóstico. Para comprobar esta hipótesis analizamos la expresión de estos genes en muestras de tumores humanos que dan lugar a metástasis. Esto se llevó a cabo analizando los estudios genómicos de Rickman, que contienen datos de expresión génica de CECyC humanos primarios que dan lugar a metástasis (Rickman, Millon et al. 2008), mediante GSEA, y determinando si los genes expresados diferencialmente en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Fig.21) estaban significativamente representados en el estudio de pacientes humanos. El resultado mostró que los genes con expresión disminuida en las metástasis de pacientes

humanos, solapaban significativamente con los genes que presentan una expresión aumentada en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Fig. 36A). Es decir, los genes con expresión aumentada en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Anexo 1) presentan una expresión disminuida en los CECyC que daban lugar a metástasis.

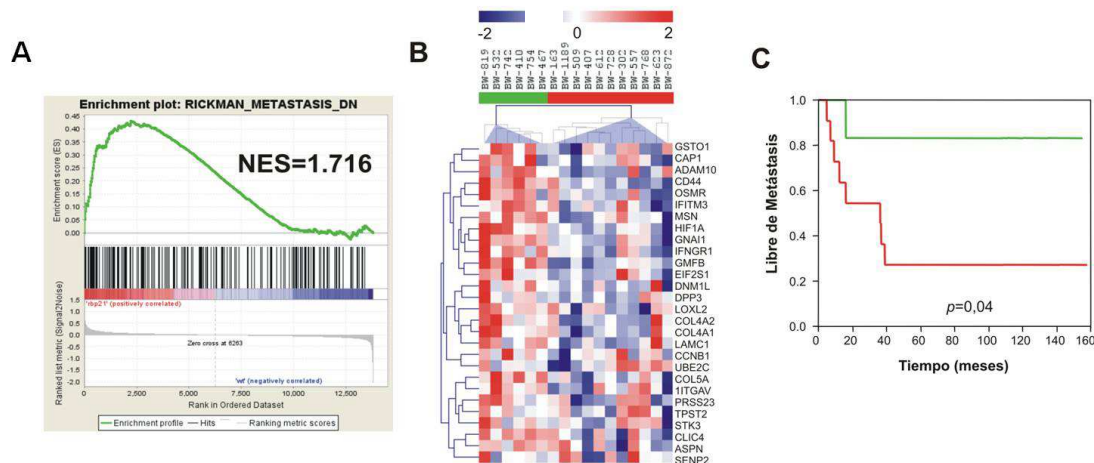


Fig. 36. Los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ como modelo de CECyC de buen pronóstico. A) Ejemplo de la comparativa por GSEA entre los genes desregulados en la piel del ratón recién nacido $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y la base de datos Rickman de tumores que dan lugar a metástasis. B) Clasificación no supervisada de las muestras de los pacientes de la base de datos Rickman utilizando la firma común humano-múrida. Esta clasificación dio lugar a dos grupos de pacientes con diferencias significativas en cuanto a supervivencia libre de metástasis. C) Kaplan-Meier en la que se observa que las muestras con peor pronóstico mostraban una expresión disminuida de los genes de la firma del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

Posteriormente, utilizando los genes de la firma humano-múrida, se realizó un análisis no supervisado de los datos de Rickman. El resultado mostró que los genes de la firma eran capaces de clasificar a los pacientes en dos grupos (Fig. 36B) con diferencias significativas en cuanto a la supervivencia libre de metástasis (Fig. 36C). Las muestras con peor pronóstico mostraban una expresión disminuida de los genes de la firma. Estos resultados apoyarían el hecho de que los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ puedan representar un modelo de CECyC de buen pronóstico.

Finalmente, el estudio comparativo realizado con la base de datos *Oncomine*, reveló que los genes con expresión aumentada en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ solapaban con los genes presentes en líneas celulares de CECyC humano sensibles o resistentes a drogas quimioterapéuticas específicas. De este modo, se predecirían como sensibles al tratamiento con drogas terapéuticas, las líneas celulares que presenten solapamiento con los genes de expresión aumentada en el ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (Tabla 7, Grupo 1), mientras que las que presenten una expresión disminuida podrían predecirse como resistentes (Tabla 7, Grupo 2).

Estos resultados indican que los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ podrían ser utilizados como herramienta para testar la especificidad de estos compuestos en terapia tumoral o quimioprevención, ya que uno de los principales problemas que existe hoy en día en los tratamientos aplicados a los pacientes, es la fuerte recurrencia de la enfermedad, junto a la resistencia a dichas drogas terapéuticas.

Tabla 7. Solapamiento entre los genes con expresión aumentada en la piel del ratón recién nacido $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los genes, tanto con expresión aumentada como con expresión disminuida, en líneas celulares de CECyC, en función de su respuesta frente a drogas quimioterapéuticas específicas. La tabla muestra el número de genes con un solapamiento significativo entre los genes con expresión aumentada en la piel del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los genes con expresión aumentada (Grupo 1) y disminuida (Grupo 2) en diferentes líneas celulares humanas de CECyC tratadas con la droga terapéutica indicada.

Grupo 1			
Referencia del estudio	Criterio: sensibilidad a drogas	Nº de genes solapantes	Valor p
Wooster Cell Line (sin publicar)	Sensible al inhibidor de MEK GSK1120212. Líneas celulares de múltiples cánceres	169	7,90E-20
Wooster Cell Line	Sensible a Paclitaxel. Líneas celulares de múltiples cánceres	123	5,81E-06
Wooster Cell Line	Sensible al inhibidor de PI3K BEZ235. Líneas celulares de múltiples cánceres	111	9,82E-04

Grupo 2			
Referencia del estudio	Criterio: resistencia a drogas	Nº de genes solapantes	Valor p
Wooster Cell Line	Sensible a Pazopanib- Líneas celulares de múltiples cánceres	146	6,81E-12
Wooster Cell Line	Sensible a Temsirolimus- Líneas celulares de múltiples cánceres	135	8,56E-09
Wooster Cell Line	Sensible al inhibidor de AURKB GSK1070916- Líneas celulares de múltiples cánceres	130	1,53E-07
Wooster Cell Line	Sensible al inhibidor de PLK GSK661637- Líneas celulares de múltiples cánceres	119	3,76E-05

3.4. Presencia de poblaciones celulares inmunosupresoras en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

Otra de las características de los CECyC humanos es que presentan una intensa inmunosupresión (Serefoglou, Yapijakis et al. 2008), por tanto quisimos comprobar si esta inmunosupresión se estaba produciendo también en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. La inmunosupresión detectada en los CECyC está mediada probablemente por poblaciones celulares supresoras derivadas de la fracción mieloide (CSDMs). Este tipo celular está constituido por poblaciones heterogéneas de células mieloides primarias, que se expanden como consecuencia de una inflamación crónica establecida en respuesta a mediadores proinflamatorios. Las CSDMs se encuentran principalmente en sangre periférica, tejido

tumoral y, en menor extensión, en nódulos linfoides. Este tipo celular se ha identificado en ratones que portan lesiones tumorales mediante la expresión de marcadores de superficie Gr-1+CD11b+, con subgrupos que expresan CD49d representando los tipos celulares más inmunosupresores (Haile, Greten et al.). En este sentido, los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ muestran un gran aumento en el tamaño de los nódulos linfáticos submaxilares (los más cercanos a las lesiones orales) e inguinales (Fig. 37A). Además, el estudio de las poblaciones celulares inmunes por citometría de flujo, mostró un incremento de los niveles de CSDMs Gr-1+CD11b+, las cuales expresan CD49d en sangre periférica y nódulos linfoides (Fig. 37B), indicando una posible inmunosupresión.

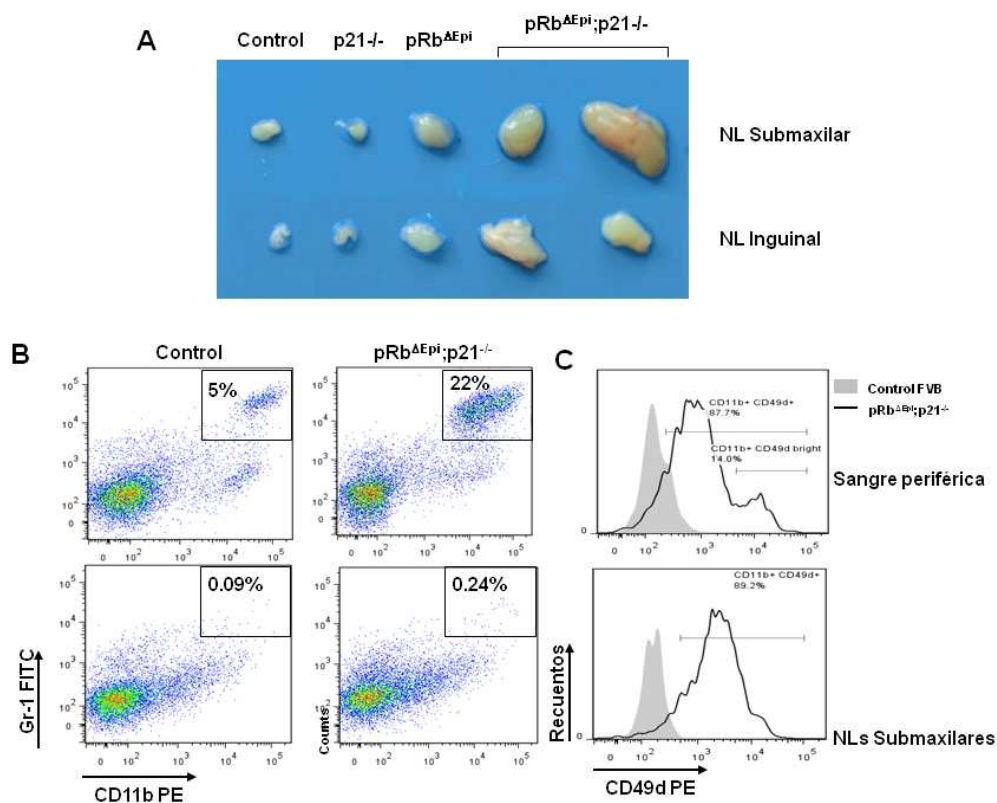


Fig. 37. Análisis del inmunofenotipo en órganos hematopoyéticos del animal $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A) apariencia de los nódulos linfáticos submaxilares e inguinales de los cuatro genotipos. B) Análisis por citometría de flujo de sangre periférica y células de los nódulos linfáticos submaxilares donde se evaluaron las CSDMs utilizando los anticuerpos Gr-1 y CD11b. C) CSDMs procedentes de ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ que expresan altos niveles del marcador CD49d, el cual define la población de CSDMs con fuerte función inhibitoria de la respuesta de células T antígeno específicas.

3.5. Desarrollo y caracterización de los tumores de lengua.

Dentro de los CECyC los tumores de lengua son los más comunes, pudiendo representar más del 40% de los tumores diagnosticados. En este sentido, nuestros resultados muestran que los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ desarrollan tumores espontáneos (Tabla 3 y Fig. 18) en cavidad oral (Tabla 3 y Fig. 18C-E'), con una elevada incidencia en la lengua (47,7%; tabla 3 y Fig. 18E-E'). En vista de estos resultados, se procedió a caracterizar en mayor profundidad los tumores de lengua, y determinar las posibles vías moleculares que estuviesen actuando en el desarrollo de los mismos.

En general, los tumores de lengua se visualizaban como excrecencias blanquecinas que afectan principalmente las áreas dorso-laterales de este órgano (Fig. 38A, A').

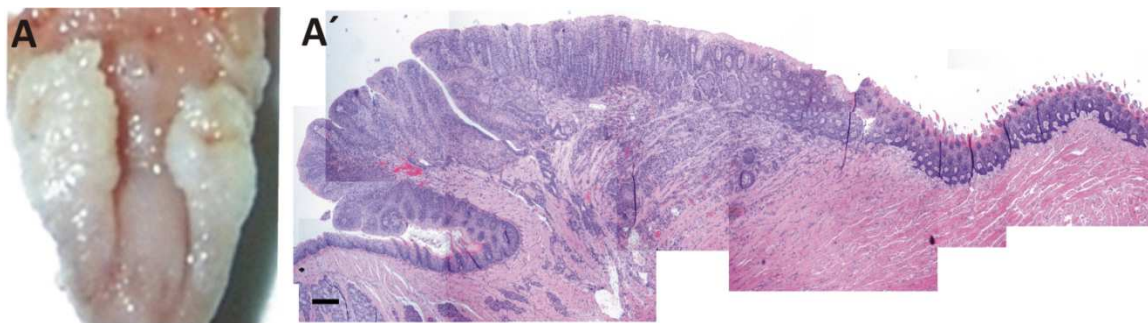


Fig. 38. Tumores de lengua observados en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-A') Apariencia macroscópica representativa de un tumor espontáneo de lengua (A) y corte histológico del mismo (A')

El análisis histopatológico determinó que estos tumores eran mayoritariamente CCEs diferenciados, caracterizados por una expansión de la expresión de K5 hacia las capas suprabasales (Fig. 39A', A''), pérdida o reducción de la expresión de K10, (Fig. 39A', B') y elevada expresión de la queratina k6 (Fig. 39B', B''). Además, se observó que la queratina K6 coexpresaba con la queratina K13, que se expresa en el epitelio suprabasal de lengua (Fig. 39A'', B'') (Santos, Paramio et al. 2002).

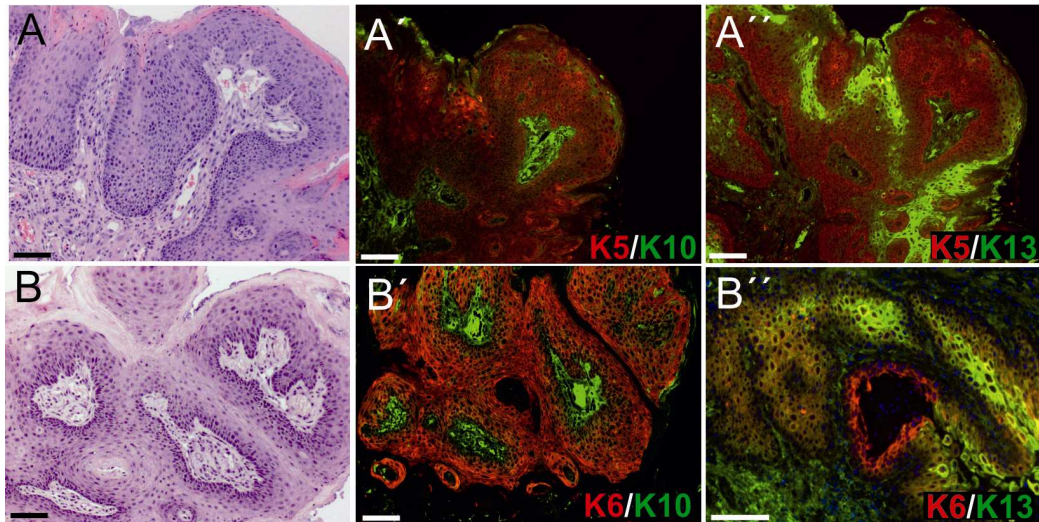


Fig. 39. Caracterización del proceso de la diferenciación de los tumores de lengua de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-B'') Caracterización de la diferenciación del epitelio en los tumores de lengua de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (A y B) mostrando la expresión de K5 (en rojo en A' y A''), K6 (en rojo en B' y B''), K10 (en verde en A' y B') y K13 (en verde en A'' y B''). Barra=100 μ m.

Estos tumores además mostraron una elevada tasa de proliferación (Fig. 40A) y presencia de infiltrados masivos de células inflamatorias $Ty\delta$ en los márgenes del tumor (Fig. 40B), que como componentes del sistema inmune innato, podrían estar regulando negativamente la respuesta inflamatoria y contribuyendo a la tumorigénesis (Nestle, Di Meglio et al. 2009).

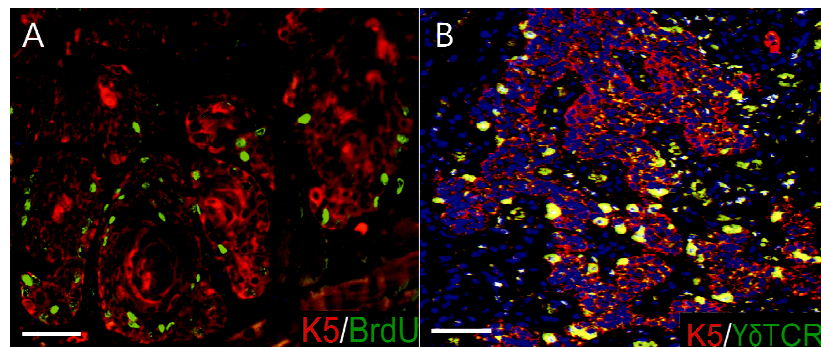


Figura. 40. Caracterización de la proliferación y presencia de células $Ty\delta$ en los CCEs en lengua de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A) Doble inmunofluorescencia mostrando la incorporación de BrdU (en verde) en el epitelio tumoral con marcaje de la queratina K5 (en rojo). y B) Imagen por inmunofluorescencia mostrando la presencia de células $Ty\delta$ (en verde) en los márgenes de un tumor espontáneo de lengua de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Barras=100 μ m.

3.6. Mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de los tumores de lengua.

A nivel molecular, los estudios realizados en CECyC ponen de manifiesto que la señalización mediada por la vía de PI3K/AKT se encuentra frecuentemente alterada (Lawrence, Stojanov et al. , Leemans, Braakhuis et al. 2011). Alteraciones en esta vía se correlacionan con un aumento de la actividad del oncogén Akt que se detecta entre un 20% y un 60% de los tumores humanos (Pedrero, Carracedo et al. 2005, Segrelles, Moral et al. 2006, Moral and Paramio 2008, Iglesias-Bartolome, Martin et al. 2013). Por ello, se decidió analizar la actividad de Akt en muestras procedentes de tumores de lengua de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. El análisis por inmunohistoquímica mostró activación de Akt (Akt-P Ser473) tanto en el núcleo como en el citoplasma de las células basales y suprabasales del epitelio tumoral (Fig. 41A y A'), y en zonas de subyacentes de infiltración del tumor (Fig. 41D). Del mismo modo, analizamos la expresión de la forma activa de la proteína ribosomal S6 (S6-P). El resultado mostró una tinción positiva para S6-P en el citoplasma de células suprabasales del epitelio (Fig. 41B), en algunas células basales (Fig. 41B' y flechas) y en áreas de infiltración del tumor (Fig. 41E).

Por otra parte, experimentos tanto *in vitro* como *in vivo* avalan la implicación de STAT3 en el desarrollo de los CECyC (Grandis, Drenning et al. 2000, Kijima, Niwa et al. 2002, Siavash, Nikitakis et al. 2004). El análisis inmunohistoquímico detectó Stat3 nuclear, de forma generalizada en todo el epitelio tumoral (Fig. 41C y C') y en áreas de infiltrado subyacente al epitelio (Fig. 41F). La forma activa de Stat3 se trasloca al núcleo por lo tanto, los tumores de lengua de los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ muestran la forma activada de Stat3.

El análisis por *western blot* de los niveles de estas proteínas, realizados a partir de extractos proteicos procedentes de la lengua de los cuatro grupos en estudio, confirmaron los resultados obtenidos por inmunohistoquímica. Las muestras de tumores de lenguas procedentes de los animales $Rb^{\Delta Epi}$ y $p21^{-/-}$ mostraron niveles más altos que las lenguas control de la forma activa Stat3 (Stat3-P) y de las formas activas de Akt (Akt-P), y de S6 (S6-P). Varias vías de señalización implicadas en la activación de Stat3 están frecuentemente alteradas en los CECyC (Cheong, Chandramouli et al. 2009). Una de las vías de señalización implicadas en la activación de Stat-3 y relacionada con el desarrollo tumoral, es la vía de las MAPKs. La activación de esta vía se ha relacionado con el desarrollo de múltiples tipos de tumores, entre ellos, los tumores orales (Lawrence, Stojanov et al. , Murugan, Munirajan et al. 2012).

Resultados

Paradójicamente, se detecta un fuerte incremento en ERK-P en aquellas muestras que no presentan aumento de las formas activas de Akt (Akt-P) (Fig. 42).

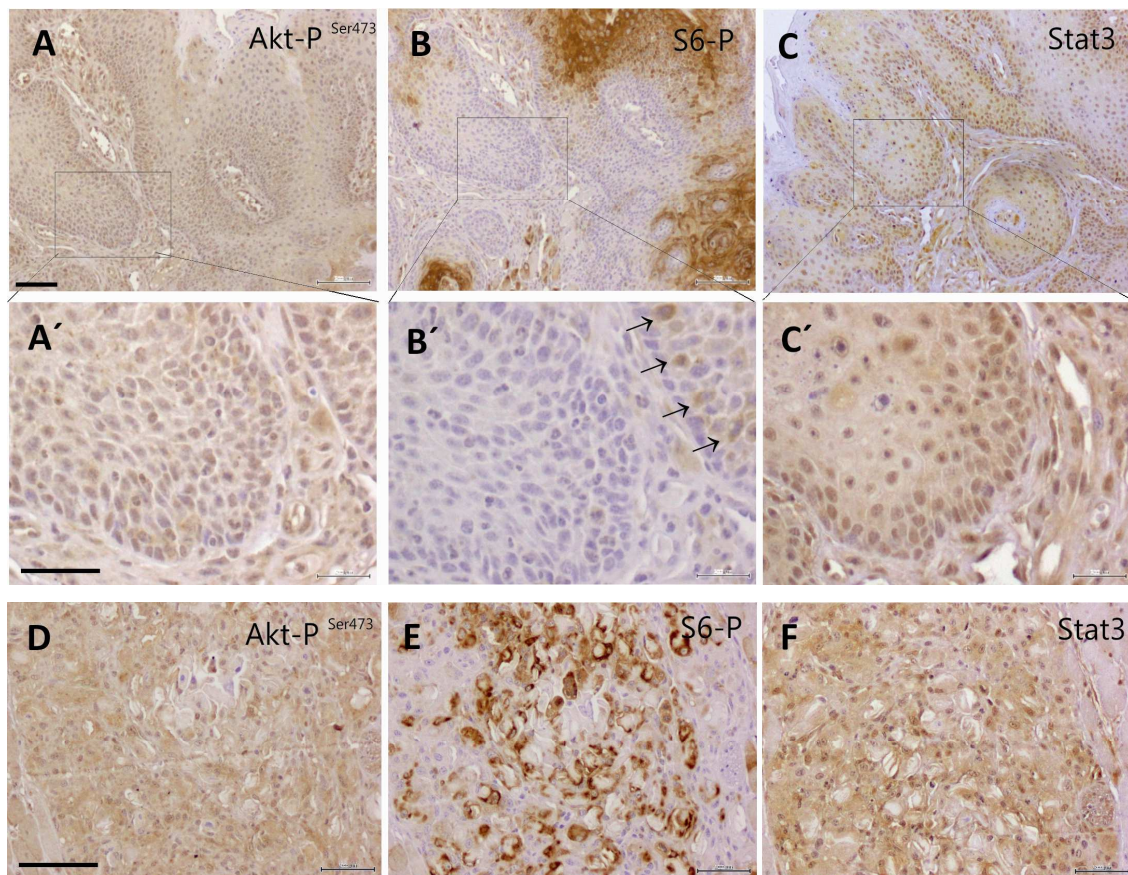


Fig. 41. Activación de Akt y Stat3 en los tumores de lengua $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. A-C'') Detección por inmunohistoquímica de las formas activas de Akt (A-A'), S6-P (B-B') y Stat3 (C-C') en el epitelio tumoral, y en áreas de infiltración del tumor subyacente al epitelio tumoral.

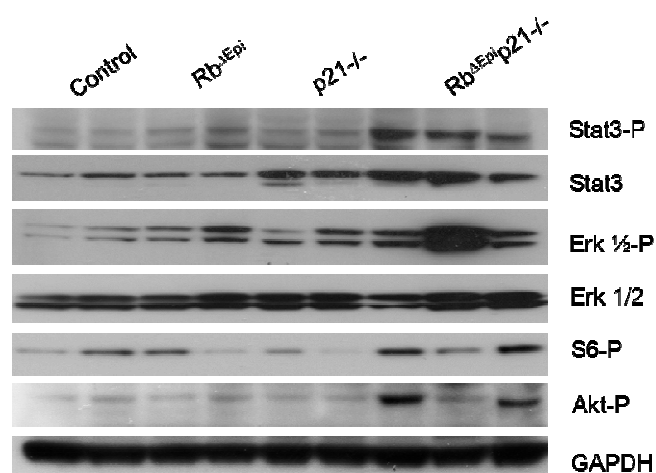


Fig. 42. Análisis bioquímico a de la activación de las vías Stat3, MAPK/ERK y Akt en los tumores de lengua $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Estudios bioquímicos representativos por western Blot a partir de muestras de lengua control, $pRb^{\Delta Epi}$, $p21^{-/-}$ y lenguas con lesión tumoral $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Se observa una mayor actividad de las vías Stat3, MAPK/ERK y Akt en las lenguas con lesión tumoral $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

En resumen, nuestros resultados muestran que los tumores orales de los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ presentan importantes similitudes con los CECyC humanos caracterizados por un buen pronóstico clínico. Estos CECyC se producen con mayor frecuencia en lengua presentando alteraciones en vías moleculares similares implicadas en el desarrollo de los tumores orales humanos.

DISCUSIÓN

p21 controla la proliferación y la diferenciación en ausencia de pRb.

La doble deficiencia en pRb y p21 en los epitelios estratificados, da lugar a un fenotipo epidérmico caracterizado por una hiperplasia severa acompañada de hiperqueratosis y paraqueratosis. La hiperplasia observada es indicativa de alteraciones en los procesos de proliferación. Las alteraciones en la proliferación como consecuencia de la deficiencia en el gen *Rb1* ya se han descrito previamente en otros sistemas (Ferguson, Vanderluit et al. 2002, MacPherson, Sage et al. 2003) incluyendo la epidermis (animales $pRb^{\Delta Epi}$), donde la ausencia de pRb conduce a una hiperplasia moderada (Ruiz, Santos et al. 2004). Nuestros resultados demuestran que las alteraciones epidérmicas observadas en los animales $pRb^{\Delta Epi}$ se agudizan significativamente con la pérdida adicional de p21, como lo indica el aumento significativo de queratinocitos en estado proliferativo en las capas basales y suprabasales epidérmicas (positivos para K5 y BrdU), la expansión de células que expresan la queratina K5 y la expresión anómala de la queratina K6 en áreas de epidermis interfolicular. Estas alteraciones no se observan en los animales deficientes en p21, en concordancia con lo descrito anteriormente (Paramio, Segrelles et al. 2001). Esto indicaría, que en ausencia de pRb, p21 podría estar regulando el control de los procesos de proliferación de los queratinocitos, como se ha reportado previamente en fibroblastos (Dimri, Nakanishi et al. 1996).

Los procesos de proliferación y diferenciación son antagónicos, de tal forma que es necesaria la parada en la proliferación para que se inicien los mecanismos de diferenciación. La deficiencia en pRb conduce a un desacoplamiento entre estos procesos. Los animales $Rb^{\Delta Epi}$ muestran queratinocitos proliferando que expresan marcadores de diferenciación temprana como K10 (Ruiz, Santos et al. 2004). Nuestros resultados indican que la pérdida de p21 incrementa significativamente el número de células proliferando que expresan K10 (indicador del comienzo de la diferenciación). Por otro lado, la hiperqueratosis y paraqueratosis presentes en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ también son claros indicadores de un proceso de diferenciación anómala. El desfase entre los procesos de proliferación y diferenciación son también evidentes en los experimentos *in vitro* de inducción de la diferenciación por calcio. Bajo estas condiciones de diferenciación, los queratinocitos de los animales control, $p21^{-/-}$ y $Rb^{\Delta Epi}$, detienen la proliferación, mientras que los queratinocitos $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ continúan proliferando. Además, tras ser re-estimulados a proliferar con bajo calcio, los queratinocitos de los animales $p21^{-/-}$, $Rb^{\Delta Epi}$ y $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, alcanzan tasas proliferativas similares a las

mostradas por células no diferenciadas, indicando que no han alcanzado una diferenciación terminal. En este sentido, observaciones previas demuestran que pRb es necesario para el mantenimiento post-mitótico de los queratinocitos sometidos a diferenciación terminal (Ruiz, Santos et al. 2004), y se ha reportado la implicación de p21 en el control de los procesos de diferenciación en muchos tipos celulares, incluyendo el queratinocito (Parker, Eichele et al. 1995, Missero, Di Cunto et al. 1996, Hauser, Agrawal et al. 1997, Harvat, Wang et al. 1998, Perucca, Cazzalini et al. 2009). En concreto, experimentos *in vitro* demuestran que los queratinocitos primarios derivados de animales nulos para p21 presentan alteraciones en la expresión de marcadores de diferenciación terminal, aunque la pérdida de p21 *in vivo* no es suficiente para desencadenar un fenotipo epidérmico (Missero, Di Cunto et al. 1996, Paramio, Segrelles et al. 2001).

En la epidermis se ha descrito que p107 ejerce una compensación funcional en el control de la proliferación, la diferenciación y en el desarrollo tumoral en ausencia de pRb (Ruiz, Santos et al. 2004). Esta compensación se debe a que la deficiencia en pRb conduce a un incremento en los niveles de la proteína p107, lo que permite a ésta ejercer funciones solapantes con pRb (Ruiz, Santos et al. 2004). El hecho de que en los animales pRb^{ΔEpi} se observe inducción del gen *Cdkn1a* e incremento de los niveles de p21 (Lara, Garcia-Escudero et al. 2008, Lara, Santos et al. 2008), podría ser indicativo de un proceso similar, en el que p21 ejercería una mayor inhibición sobre los complejos ciclina/CDK o sobre los factores de transcripción de la familia E2F, con los que interacciona. Se ha descrito, que los efectos observados en los animales Rb^{ΔEpi} se deben en parte a la activación permanente de los factores E2F, actividad que aumenta drásticamente con la pérdida de p107 (Ruiz, Santos et al. 2004, Lara and Paramio 2007). El incremento en los niveles de p107 podría estar favoreciendo su afinidad para formar complejos con los factores E2F activadores, que normalmente se unen a pRb (Lee, Cam et al. 2002, Ruiz, Santos et al. 2004). En este sentido, nuestros resultados muestran que el incremento en la actividad de los factores E2F en los queratinocitos de los animales Rb^{ΔEpi}, aumentan significativamente con la deficiencia adicional de p21, mostrando un aumento de la expresión de E2Fs activadores y represores. El aumento de la actividad, y la expresión desregulada de miembros específicos de estos factores, podría ser parcialmente responsable del fenotipo epidérmico y de la alteración en la expresión génica observada en la piel de los animales pRb^{ΔEpi}/p21^{-/-}. Por otro lado, en este caso los efectos no pueden atribuirse a una compensación por parte de p107 al no observarse un aumento en los niveles de esta proteína. Además, los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} muestran alteraciones fenotípicas distintas a las observadas en los animales pRb^{ΔEpi};p107^{-/-}, como la paraqueratosis, la presencia de una

respuesta inflamatoria exacerbada o la aparición de heridas espontáneas, indicando que los mecanismos de compensación de la ausencia de pRb ejercidos por p107 o p21 son posiblemente diferentes. Paradójicamente, a pesar de que p21 es una diana transcripcional de p53, la eliminación de *Trp53* en los animales pRb^{ΔEpi} no modifica el fenotipo epidérmico (Martínez-Cruz, Santos et al. 2008), sugiriendo que las funciones que ejerce p21 en ausencia de pRb, son independientes de p53.

Los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} presentan una pérdida de pelo severa, con folículos pilosos anómalos que muestran hiperplasia de la vaina radicular externa e hiperplasia de las glándulas sebáceas. Además, desarrollan heridas espontáneas que en algunos casos no llegan a cicatrizar con normalidad. Todas estas alteraciones sugieren alteraciones en la funcionalidad de la población de células madre foliculares. Experimentos previos de LRC demuestran que la pérdida de *Rb1* conduce a un aumento de la proliferación de las células madre foliculares, sin que esto ocasione una depleción de esta población, ni modifique sus capacidades (Lorz, García-Escudero et al. 2010). De hecho, los animales pRb^{ΔEpi} se muestran más eficientes en cuanto a la regeneración de heridas y crecimiento del pelo *de novo* (Lorz, García-Escudero et al. 2010), lo cual apunta a que la disminución en la población LRC positiva, se debe principalmente a un aumento de la proliferación/división de las células madre foliculares (Lorz, García-Escudero et al. 2010). Estos efectos se han vinculado al aumento en la actividad de los factores E2F, detectada como consecuencia de la ausencia de pRb (Lorz, García-Escudero et al. 2010). Por otra parte, se ha descrito que la pérdida de p21 promueve la expansión de una subpoblación de queratinocitos con una elevada capacidad proliferativa y capaces de diferenciar en los distintos tipos celulares epidérmicos, siendo consideradas células madre (Topley, Okuyama et al. 1999). Por el contrario, nuestros resultados muestran que la pérdida de p21 en animales pRb^{ΔEpi}, da lugar a una disminución en las células madre foliculares, (K15 y CD34 positivas), lo que conduce a defectos en la homeóstasis epidérmica, como lo demuestra el retraso en la curación de heridas y las anomalías en cuanto al crecimiento del pelo que se observan incluso en los injertos de piel transplantada. El descenso en la población de células madre foliculares es más acusado en los folículos distróficos que presentan glándulas sebáceas hiperplásicas, que podrían ser la causa de la pérdida de pelo observada en los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}. Este mismo fenotipo aparece en ratones que sobreexpresan *c-Myc* en la capa basal de la epidermis (Arnold and Watt 2001, Waikel, Kawachi et al. 2001). Cabe la posibilidad de que el aumento de expresión de *c-Myc* detectada en la piel de los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} pudiese estar favoreciendo la diferenciación de las células madre foliculares a sebocitos.

La disminución en los marcadores de células madre foliculares se ha observado en otros sistemas murinos, cuando se establecen periodos hiperproliferativos extensos en la epidermis, causando una movilización excesiva y el agotamiento de la población (Ganuza, Saiz-Ladera et al. 2012). Sin embargo en este caso, la depleción observada en las células madre foliculares no es suficiente para comprometer la viabilidad de los animales. Desafortunadamente, debido al rápido deterioro y alta letalidad que presentan los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, no hemos podido realizar experimentos de LRC, ni de funcionalidad de esta población (como regeneración de heridas y crecimiento de pelo) que nos hubieran permitido dilucidar mejor el efecto que ocasiona la pérdida de pRb y p21 sobre las células madre foliculares.

Los cambios en la actividad de E2F, así como las variaciones en la expresión de los distintos factores E2F detectadas en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, podrían ser la causa de los efectos encontrados, reforzando la relevancia del eje Rb-E2F en el correcto mantenimiento de la proliferación de las células madre epidérmicas. Además, la piel de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ muestra alteraciones en las vías moleculares de Wnt/ β -catenina, Hedgehog y Notch, ejes moleculares importantes en la homeostasis, movilización y diferenciación hacia determinados linajes de las células madre foliculares, que podrían contribuir a las anomalías encontradas en esta población de células madre (Fuchs and Raghavan 2002, Blanpain and Fuchs 2006). Para una mejor caracterización del proceso sería necesario comprobar cuál es el estado de estas vías en esta subpoblación por ejemplo, mediante el análisis de expresión génica comparativa entre animales control, $pRb^{\Delta Epi}$ y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ realizados a partir de células madre foliculares aisladas mediante marcadores específicos (CD34+). No obstante, como se mencionó anteriormente, tanto la alta letalidad como el bajo número de células CD34+ detectadas pueden representar problemas para la posible viabilidad de estos experimentos. Debido a los pocos folículos pilosos en los que se detecta expresión de K15, tampoco hemos podido obtener resultados concluyentes en experimentos de colocalización, mediante inmunofluorescencias de células K15 y miembros de las vías de Wnt/ β -catenina, Hedgehog y Notch.

p21 modula la respuesta a daño por estrés replicativo y la inflamación, en ausencia de pRb.

La epidermis de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ muestran un estado hiperproliferativo como consecuencia de la pérdida simultánea de dos controladores del ciclo celular, pRb y p21. Este hecho planteó la posibilidad de que se estuviera produciendo un fenómeno de estrés replicativo. El estrés replicativo resulta tóxico para la célula, ya que propicia la recombinación y el inicio de reordenamientos genómicos (Cimprich and Cortez 2008, Lopez-Contreras and Fernandez-Capetillo 2010), y ocasiona el mismo tipo de daño en el ADN que se induce por la acción de oncogenes, permitiendo a la célula su entrada en fase S de forma descontrolada (Halazonetis, Gorgoulis et al. 2008). Los resultados obtenidos en los animales recién nacidos y adultos $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ demuestran que la doble deficiencia de pRb y p21 ocasiona daño en al ADN y activación de los mecanismos de reparación, como lo demuestra la expresión nuclear de H2AXy (Fragkos, Jurvansuu et al. 2009) y la inducción de p53 en estas mismas células. Probablemente este efecto se deba al estrés proliferativo que se produce en estas células como consecuencia de la desregulación del control del ciclo celular. La tinción positiva de H2AXy abarcando todo el núcleo y la activación del mecanismo de reparación mediado por el eje molecular ATR/CHK1, son eventos indicativos de que las células han activado los mecanismos de reparación de daño por estrés replicativo (Toledo, Murga et al. , Cimprich and Cortez 2008). Los queratinocitos $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ son capaces de diferenciar sin haber detenido la proliferación, lo que puede ocasionar un aumento de daño en el ADN, detectándose células dañadas en las capas suprabasales de la epidermis. El hecho de que el incremento proliferativo que se produce en los queratinocitos, como consecuencia de la ausencia de pRb en epidermis, no sea suficiente para producir un daño en el ADN, sugiere que estos efectos pudieran deberse a la ausencia de p21. Estos resultados concuerdan con lo reportado en fibroblastos, en los que la deficiencia de p21 es suficiente para inducir daño en el ADN, y aumento en la expresión génica y en los niveles de H2AXy, ATM, ATR y CHK1 (Perucca, Cazzalini et al. 2009). Además, los datos obtenidos en los análisis de enriquecimiento génico (Tabla 4), realizados en los genes expresados diferencialmente entre la piel de un animal control y $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, muestran similitudes con grupos de genes relacionados con la expresión génica dependiente de p53, como daño y mecanismos de reparación del ADN, y con los modelos animales $p53^{\Delta Epi}$ y $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$; lo que confirman la implicación del eje p53/p21 en la regulación de los mecanismos de reparación del daño en la epidermis.

Se ha reportado que la pérdida de p53 en la epidermis, da lugar a un aumento en la proporción de mitosis aberrantes, fenómenos de inestabilidad cromosómica y aneuploidías, tanto en la piel como en los tumores espontáneos que se desarrollan en estos animales (Martínez-Cruz, Santos et al. 2009). Estos efectos son parcialmente análogos a los que se producen como consecuencia de la deficiencia de pRb y p21 en epidermis. La epidermis de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ muestran una gran cantidad de mitosis aberrantes, que pueden deberse a la inestabilidad genómica que se produce como consecuencia del estrés replicativo al que están sometidas estas células. Fenómenos similares de inestabilidad genómica y cromosómica se han reportado en modelos animales deficientes en p21 en combinación con otros supresores de tumores, debidas a alteraciones en el mecanismo de reparación y apoptosis (Barboza, Liu et al. 2006). Como se ha comentado en la introducción, las funciones que ejerce p21 en relación a los mecanismos de respuesta a daño en el ADN, dependen del nivel del mismo. Niveles bajos de daño favorecen la estabilización de p21, permitiendo la parada de ciclo celular y la acción de los mecanismos de respuesta y reparación del ADN, mientras que niveles elevados promueven la degradación de p21, permitiendo que las células dañadas se eliminen como consecuencia de la activación de los mecanismos de apoptosis dependientes de p53 (Cazzalini, Scovassi et al. 2010). Sin embargo, la apoptosis no parece ser el mecanismo de eliminación de las células en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, ya que, a pesar del incremento en los niveles de la proteína p53 que se observa en la piel y en los tumores, no se detecta actividad de caspasa 3 ni procesamiento de Parp. Además, los datos de enriquecimiento funcional en procesos biológicos, realizados a partir de los genes diferencialmente expresados entre animales control y los $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, muestra una disminución en la expresión de genes relacionados con la regulación de la apoptosis. El hecho de que se detecte esta disminución tanto en genes pro-apoptóticos como antiapoptóticos, puede sugerir que a nivel génico se está produciendo un equilibrio entre las señales que inducen o reprimen la apoptosis, aunque nuestros resultados parecen indicar un posible predominio de las señales anti-apoptóticas. En los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, parte de las células dañadas podrían estar siendo eliminadas mediante la activación del proceso de catástrofe mitótica, como lo confirma el incremento de células con esta alteración detectada en estos animales. Este mecanismo se ha implicado previamente en la muerte celular como consecuencia de células con daño en el ADN por estrés replicativo (Lopez-Contreras and Fernandez-Capetillo 2010).

Estas observaciones en su conjunto, indicarían que en la epidermis, el aumento proliferativo que se produce como consecuencia de la eliminación de pRb, no es suficiente para desencadenar un daño en el ADN o inestabilidad genómica, siendo necesaria la alteración en la señalización del eje p53/p21 para que se desencadenen estos procesos. Los datos obtenidos apuntarían a que en ausencia de pRb, p21 estaría ejerciendo un importante papel en la señalización dependiente de p53 implicada en la regulación de los mecanismos de reparación del daño en el ADN. Sin embargo, en este contexto p21 estaría realizando algunas funciones no dependientes de p53, como lo demuestra la ausencia de apoptosis en los queratinocitos pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} dañados, o la falta de agravamiento fenotípico observado en los animales pRb^{ΔEpi};p53^{ΔEpi}, (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008), discordante con las observaciones en los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}.

Otra de las alteraciones que se producen debido a la deficiencia conjunta en pRb y p21 en epidermis, es el disparo de un proceso inflamatorio de origen innato, caracterizado por la presencia de linfocitos, mastocitos, macrófagos, células Tγδ (Coussens and Werb 2002, Nathan 2002). Esto probablemente ocurre, como consecuencia de la liberación de factores característicos de la respuesta innata (GCSF, GMCSF, CXCL1 o CCL3) atrayentes de linfocitos, granulocitos, macrófagos, monocitos y células dendríticas (Coussens and Werb 2002, Nathan 2002). Además, se detecta un incremento de proteínas implicadas en la maduración de células dendríticas y en la función linfocitaria como IL16, de moléculas potenciadores de este tipo de respuesta como TREM, y una disminución de CCL1, implicada en la resolución de la respuesta inmune de enfermedades inflamatorias cutáneas (Pastore, Mascia et al. 2004). En este sentido, se ha descrito una conexión entre p21 y la función del sistema inmune, en relación con la proliferación, la activación y maduración de linfocitos T de memoria, y las enfermedades autoinmunes como el lupus (Balomenos, Martin-Caballero et al. 2000, Arias, Ballesteros-Tato et al. 2007). Sin embargo, la respuesta inflamatoria que observamos no parece que se deba únicamente a la liberación de componentes pro-inflamatorios y al reclutamiento hacia la piel de células del componente inmune, sino también a las alteraciones que se producen en el propio queratinocito como consecuencia de la pérdida de pRb y p21, dado que se detecta una respuesta inflamatoria en los injertos de piel de recién nacido pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} realizados sobre ratones inmunodeficientes.

Dos de las vías de señalización más importantes relacionadas con los procesos inflamatorios, son las mediadas por la familia de NFκB y por Stat3 (Karin and Greten 2005, Mantovani, Allavena et al. 2008). Estas vías están vinculadas a una respuesta inflamatoria innata en las que p21 tiene un papel destacado (Abbas and Dutta 2009). Resultados previos han reportado una respuesta inflamatoria moderada en los modelos $p53^{\Delta Epi}$ y $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$ (Martinez-Cruz, Santos et al. 2009), que no se observa en los animales $pRb^{\Delta Epi}$, lo que apunta a una posible implicación de la vía de p53 en el control de la respuesta inflamatoria. Se sabe que p53 es un inhibidor de la inflamación que actúa como antagonista de NFκB, inhibiendo la transcripción de promotores dependientes de este factor nuclear (Karin and Delhase 2000). Los resultados en estos modelos animales, apuntan a que en ausencia de pRb en la epidermis, p53 y en mayor medida p21, estarían controlando el disparo de esta respuesta inflamatoria. Es posible que parte de este control se produzca a nivel transcripcional, modulando la transcripción de promotores dependientes de este factor nuclear (Komarova, Krivokrysenko et al. 2005). De hecho p21, es un regulador transcripcional directo de NFκB (Abbas and Dutta 2009). El hecho de que en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ se detecte una activación de la vías NFκB y Stat3 previa al disparo de la respuesta inflamatoria, como lo demuestra el incremento en los niveles de las formas activas de p65 y Stat3 detectada en la piel de los animales recién nacidos, indica que la activación de estas vías podría ser el detonante de la respuesta inflamatoria, que además podría contribuir al desarrollo tumoral. Resultados similares se han reportado en la epidermis como consecuencia del incremento en la actividad de NFκB producida por la sobreexpresión de la unidad catalítica IKKβ, en la capa proliferativa de la epidermis. Estos animales presentan un inflamación crónica exacerbada y desarrollo de tumores orales (Page, Navarro et al. 2010) similares a los que se producen en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21$. El tratamiento de los animales con inhibidores de la vía de NFκB, como los glucocorticoides (De Bosscher, Schmitz et al. 1997, De Bosscher, Vanden Berghe et al. 2003), podría ayudar a confirmar la implicación de la vía de NFκB en el disparo del proceso inflamatorio y en el desarrollo tumoral detectado.

Los datos obtenidos sugieren que la deficiencia epidérmica en pRb y p21 ocasiona un estado de hiperproliferación en el queratinocito que conduce a un estrés replicativo. Este estrés replicativo, ocasiona un daño en el ADN e inestabilidad genómica que puede estimular una respuesta inflamatoria. Esta respuesta inflamatoria a su vez puede sustentar tanto la hiperproliferación como el estado de estrés replicativo, de tal forma que se podría estar estableciendo una co-estimulación entre todos estos procesos, que contribuiría al desarrollo tumoral observado en estos animales.

p21 se comporta como un supresor tumoral en ausencia de pRb en epidermis.

Aunque en general los datos de desarrollo tumoral espontáneo o por protocolos de carcinogénesis química otorgan a p21 un papel como supresor tumoral en piel, existe cierta controversia a este respecto debido a que algunos datos son compatibles con funciones oncogénicas. La discrepancia en los resultados obtenidos, puede ser consecuencia del fondo genético empleado (Missero, Di Cunto et al. 1996, Weinberg, Montano et al. 1997, Topley, Okuyama et al. 1999, Weinberg, Fernandez-Salas et al. 1999, Basile, Eichten et al. 2003). Se ha reportado que los ratones nulos para p21 (en un fondo C57BL6/129Sv) desarrollan tumores espontáneos tales como: sarcomas císticos, tumores de origen vascular y, en menor proporción, tumores epiteliales. El desarrollo de estos tumores, se produce con una incidencia muy baja y a edades tardías (Martin-Caballero, Flores et al. 2001). Sin embargo, la deficiencia de p21 en combinación con otras alteraciones genéticas provoca un incremento de la tumorigénesis (Dimri, Nakanishi et al. 1996, Missero, Di Cunto et al. 1996, Brugarolas, Moberg et al. 1999, Philipp, Vo et al. 1999, Paramio, Segrelles et al. 2001, Martin-Caballero, Flores et al. 2004, Abbas and Dutta 2009). Los resultados confirman estas observaciones, ya que por una parte, los animales nulos para p21 desarrollan tumores con muy baja frecuencia y a edades avanzadas, en concordancia con lo descrito anteriormente (Martin-Caballero, Flores et al. 2001), mientras que la deficiencia conjunta de p21 y de pRb en la epidermis (animales $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$) acelera la cinética de aparición de los tumores (edad mínima de detección de 2 semanas) e incrementa significativamente su incidencia (39/44), además de cambiar el tipo tumoral hacia aquellos originados en epitelios estratificados. Estos resultados también se refuerzan por los datos de trasplantes, en los que solamente se detecta la aparición de tumores en los injertos procedentes de animales recién nacidos $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$. Dado que no hemos detectado la aparición de tumores espontáneos en los ratones $pRb^{\Delta Epi}$, tal como se había reportado previamente (Ruiz, Santos et al. 2004) ni en trasplantes, nuestros datos indican que p21 actúa como un supresor tumoral en ausencia de pRb.

p21, además de participar en el control del ciclo celular mediante la modulación de la actividad de las CDKs (Dotto 2000), ejerce otra serie de funciones (Di Cunto, Topley et al. 1998, Dotto 2000, Devgan, Mammucari et al. 2005, Devgan, Bach-Cuc et al. 2006, Marques-Torrejon, Porlan et al. 2013), interaccionando con diversos factores de transcripción y/o coactivadores (Abbas and Dutta 2009). Nuestros datos indican que p21 es capaz de controlar la replicación del ADN en ausencia de pRb, este proceso puede deberse a su capacidad de interaccionar con

los factores E2F (Afshari, Nichols et al. 1996, Dimri, Nakanishi et al. 1996). Dado que en ausencia de pRb la acción o los efectos represores de p21 sobre los complejos ciclinas/CDK no son evidentes, no es descartable una posible acción de p21 sobre estos complejos que pudiese afectar a otros miembros de la familia Retinoblastoma (p107 y/o p130), que están controlados también por procesos de fosforilación dependientes de ciclinas/CDKs. Además, el control en la replicación del ADN mediado por p21 (por ejemplo, actuando sobre PCNA), estaría frenando el daño y la inestabilidad genómica que pudiera producirse como consecuencia de la pérdida de control del ciclo celular ocasionado por la ausencia de pRb. Otro aspecto que podría contribuir al desarrollo tumoral observado, es la desregulación génica detectada en la piel del ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ que se produce como consecuencia del aumento en la actividad y en la expresión de *E2f*, activadores y/o represores.

p21 es una diana transcripcional del supresor tumoral p53, el cual coopera con pRb para prevenir el desarrollo de tumores espontáneos (Martinez-Cruz, Santos et al. 2008). De hecho, el modelo de ratón $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$ se caracteriza por el desarrollo más acelerado de tumores agresivos, en comparación con animales $p53^{\Delta Epi}$, que probablemente se deba a una mayor proliferación y una anticipada inestabilidad cromosómica (Martinez-Cruz, Santos et al. 2009). Además, el transcriptoma de estos animales presenta importantes similitudes a con el transcriptoma de tumores humanos de carácter maligno y mal pronóstico (Garcia-Escudero, Martinez-Cruz et al. 2010, Duenas, Santos et al. 2012). Aunque nuestros resultados muestran que el transcriptoma de la piel de los animales $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$ presenta importantes similitudes con el de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, existen diferencias significativas ya que, al contrario que los $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$, los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ manifiestan un agravamiento fenotípico con respecto a los animales $pRb^{\Delta Epi}$, y no hemos detectado metástasis evidentes. Además, el transcriptoma de las pieles de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ muestran analogías con los tumores de buen pronóstico, contrariamente a lo observado en los animales $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$ (Martinez-Cruz, Santos et al. 2009, Garcia-Escudero, Martinez-Cruz et al. 2010, Duenas, Santos et al. 2012). Todos estos datos apuntan a que, en ausencia de pRb, las posibles funciones ejercidas por p21 y p53 son parcialmente diferentes.

Otro aspecto que podría estar contribuyendo a la supresión tumoral ejercida por de p21 en ausencia de pRb, puede ser consecuencia de su capacidad de actuar como un regulador transcripcional negativo de las vías de señalización de Wnt y Notch en el control del crecimiento de los queratinocitos (Devgan, Mammucari et al. 2005). Nuestros resultados demuestran que la deficiencia de p21 en animales $pRb^{\Delta Epi}$, conduce a alteraciones en genes

que indican la activación de las vías moleculares de Wnt, Hedgehog y Notch. La señalización de Wnt conduce a la regulación de genes diana relacionados con procesos de proliferación, diferenciación y supervivencia, y a la acumulación de β -catenina (Clevers 2006). En este sentido, se sabe que β -catenina es esencial en la tumorigénesis epidérmica, ya que sustenta específicamente la población de células madre cancerosas debido en parte a la activación de *c-Myc* (Malanchi, Peinado et al. 2008). Este factor de transcripción activa genes involucrados con proliferación, y su activación es suficiente para promover el desarrollo tumoral (Pelengaris, Littlewood et al. 1999). Nosotros detectamos un aumento en la expresión de *c-Myc*, probablemente como consecuencia de la activación de Wnt/ β -catenina, que podría estar implicado en el desarrollo tumoral observado. Otra de las consecuencias de la deficiencia de p21 en los animales $pRb^{\Delta Epi}$ es la activación de las vías de Hedgehog y Notch, ampliamente relacionadas con procesos de proliferación, homeostasis y carcinogénesis epidérmica (Colmont, Harding et al. 2012). Se ha otorgado un posible papel supresor de tumores a la señalización dependiente de Notch en piel y en CECyCs (Nicolas, Wolfer et al. 2003, Agrawal, Frederick et al. 2011, Stransky, Egloff et al. 2011). Sin embargo, en estos animales la activación de Notch no parece ser suficiente para frenar el desarrollo tumoral, esto en parte puede deberse a que algunas de las funciones de Notch como supresor tumoral se han asociado a la parada proliferativa mediada por la inducción de p21 (Pickering, Zhang et al. 2013), un proceso que claramente no se está produciendo en los animales $pRb^{\Delta Epi}; p21^{-/-}$. Otra de las alteraciones frecuentes en los CECyC son las alteraciones en la expresión de *Trp63* (Agrawal, Frederick et al. 2011, Stransky, Egloff et al. 2011, Lui, Hedberg et al. 2013, Pickering, Zhang et al. 2013), utilizándose sus niveles de expresión y su localización núcleo/citoplasma positiva, como criterios útiles de identificación de CECyC (Priya, Arpitha et al. 2011). p63 es esencial para la morfogénesis epidérmica (Mills, Zheng et al. 1999, Koster and Roop 2004, King and Weinberg 2007, Koster, Dai et al. 2007) y su expresión puede modularse indirectamente por los miembros de la familia de Retinoblastoma (Ruiz, Segrelles et al. 2003, Costa, Santos et al. 2012). Nosotros detectamos un aumento en la expresión de $\Delta Np63$, la forma más predominante de p63 en los epitelios estratificados, que podría estar contribuyendo al desarrollo tumoral detectado. Sin embargo, la relación de p63 y el desarrollo tumoral es controvertida. En este sentido, el aumento de expresión de $\Delta Np63$ en CCEs humanos (Dannenberg, van Rossum et al. 2000, Tonon, Brennan et al. 2005) es capaz de suprimir la senescencia prematura inducida por Ras (Keyes, Pecoraro et al. 2011, Zhang, Cheng et al. 2012). Sin embargo, también se ha observado que en ciertos tipos de tumores su expresión se pierde en el frente invasivo, por lo que algunos estudios le otorgan un papel inhibidor de metástasis (Bosch, Panoutsopoulou et al. 2014). Actualmente, la hipótesis más sustentada es

que probablemente la activación de $\Delta Np63$ sea un evento oncogénico temprano que se pierda durante la progresión tumoral. En la epidermis, Notch y p63 están relacionadas con procesos de proliferación/diferenciación. En este sentido, se ha postulado que $\Delta Np63$ promueve la renovtación de los queratinocitos basales mediante un mecanismo que requiere la represión de *Notch* y *Cdkn1a* (Milner and Bigas 1999, Philipp, Vo et al. 1999) y se ha reportado que la diferenciación terminal en los epitelios escamosos está mediada por la transactivación de *Notch1* inducida por p53, activación que es inhibida por $\Delta Np63$ (Topley, Okuyama et al. 1999). Estos datos, han planteado la hipótesis de que en los CECyC las alteraciones en estos genes podrían estar modificando el programa de proliferación/diferenciación en las células precursoras de estos tumores (Nicolas, Wolfer et al. 2003). En nuestro caso, no detectamos un descenso en la actividad de Notch como consecuencia del aumento en la expresión de $\Delta Np63$. En este sentido, sería interesante analizar cómo está la expresión de estos ejes moleculares en muestras de lengua procedentes de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ con o sin lesiones tumorales, ya que los tumores detectados, aunque muestran tasas proliferativas elevadas, son diferenciados y de buen pronóstico. Por último, no observamos cambios en los niveles de TAp63, isoforma que bajo determinadas condiciones puede comportarse como un represor de metástasis (Adorno, Cordenonsi et al. 2009, Su, Chakravarti et al. 2010).

Se ha observado que los tumores que se desarrollan en estos animales se encuentran frecuentemente en zonas próximas a heridas espontáneas. La relación entre la presencia de heridas y el desarrollo de tumores epiteliales está ampliamente establecida, aunque los mecanismos moleculares que subyacen a esta asociación son todavía desconocidos. Recientemente, se ha reportado que las heridas aceleran el desarrollo tumoral epitelial, ya que favorecen la movilización de las células iniciadoras tumorales desde las zonas de los folículos (Kasper, Jaks et al. 2011, Wong and Reiter 2011). Por tanto, es posible que en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, estas heridas estén actuando como un agente promotor del desarrollo tumoral. Uno de los primeros tipos de células en acudir durante el proceso de repitelización de la herida, es una población de células progenitoras residentes en el folículo y caracterizada por una elevada expresión de Lgr5 (Ito, Liu et al. 2005). De hecho, se ha observado que esta población puede ser el origen de los tumores en animales transgénicos que expresan las oncoproteínas virales E6 y E7 de VPH16 (da Silva-Diz, Sole-Sanchez et al. 2013). Dado que, como consecuencia de la activación de Wnt, detectamos un incremento en la expresión de Lgr5 en la piel de estos animales, sería interesante determinar la posible movilización de esta subpoblación celular desde los folículos hacia la zona de las heridas. Sin embargo como ya se ha comentado, la fragilidad de estos animales y la gran cantidad de folículos aberrantes que se

observan no nos ha permitido analizar en profundidad el proceso de curación de heridas, ni realizar experimentos de trazado de linajes de poblaciones.

Otro aspecto a considerar en la supresión tumoral ejercida por parte de p21 es la posible regulación de los procesos inflamatorios. Como ya hemos discutido anteriormente, nuestros resultados muestran que, como consecuencia de la deficiencia de p21 en ratones $pRb^{\Delta Epi}$, se establece un proceso inflamatorio exacerbado que probablemente esté favoreciendo el desarrollo tumoral. De hecho, el patrón de citoquinas observado en el ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, caracterizado por un infiltrado mayoritariamente de origen innato, es similar al detectado en varios tipos de tumores (Arwert, Hoste et al. , Srivastava, Zhu et al. , Ford and McVicar 2009, Acharyya, Oskarsson et al. 2012). Además, los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ manifiestan una sobreexpresión de citoquinas (CXCL1, CXCL2, CCL3 y TREM) con funciones pro-tumorales. Se ha descrito que CXCL1 (GRO α) es secretada por diversas células tumorales y está relacionada con procesos de proliferación y angiogénesis, considerándose un posible oncogén (Richmond and Thomas 1988, Balentien, Mufson et al. 1991, Owen, Strieter et al. 1997, Vandercappellen, Van Damme et al. 2008). De forma análoga, la producción de CXCL2 se ha detectado en una variedad de líneas celulares tumorales (Coussens and Werb 2002, Vandercappellen, Van Damme et al. 2008), y en CECyC y en cáncer de pulmón, se ha relacionado la producción de CCL3 con la neovascularización y metástasis tumoral (Silva, Ribeiro et al. 2007, Wu, Li et al. 2008). En contraposición al aumento en los niveles de estas quimioquinas pro-angiogénicas, se observa una disminución de quimioquinas con actividad angioestática como CXCL9 (Coussens and Werb 2002, Mantovani, Allavena et al. 2008). Por otra parte, los niveles de TREM observados podrían estar regulando el disparo de la respuesta inmune, así como modificando la respuesta antitumoral mediada por los macrófagos asociados a tumores (TAM) (Ford and McVicar 2009). Entre los aspectos a considerar en experimentos futuros, se incluye la caracterización de la posible polarización de los macrófagos encontrados en los tumores de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, con el fin de determinar su posible papel anti (M1) o protumoral (M2). Otro aspecto, que sería merecedor de análisis futuros, afecta a la ausencia de incremento en ciertas quimioquinas/citoquinas, cuya expresión es muy dependiente de la activación de la vía de NF κ B. En concreto, no detectamos un incremento en los niveles de IL 1 α , IL6 o TNF α , que se pueden asociar al desarrollo tumoral en animales que sobreexpresan la subunidad IKK- β del complejo IKK (animales K5/IKK- β (Page, Navarro et al. 2010)). Esta ausencia sugiere que la activación de este eje puede no ser completa, e indica que otras vías de señalización convergen en el desarrollo de la respuesta inflamatoria. En futuros experimentos, sería de interés averiguar si la inhibición o el bloqueo de uno o varios de estos

factores quimiotácticos (por ejemplo empleando inyecciones de anticuerpos neutralizantes) consigue reducir la carga e incidencia tumoral, de forma análoga a los estudios reportados en cáncer de mama para el receptor de las quimioquinas CXCL1 y 2 (Acharyya, Oskarsson et al. 2012).

La elevada presencia de células inflamatorias, tanto en las pieles como en las zonas circundantes a los tumores de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, previsiblemente están actuando como promotoras del desarrollo tumoral. Existen evidencias que indican que el control de los bucles autocrinos/paracrinos pro-tumorigénicos, podría representar una vía terapéutica valiosa para el tratamiento de los CECyC, en parte debido a las características inmunosupresoras que presentan este tipo de tumores (Serefoglou, Yapijakis et al. 2008). De hecho, se ha reportado que bajo ciertas circunstancias, como por ejemplo durante el proceso de curación de heridas, la activación de la vía molecular de PI3K conduce a un aumento en la producción de citoquinas mediado por células T dendríticas epidérmicas (células $T\gamma\delta$), que podría estar contribuyendo al aumento de la respuesta inflamatoria y al desarrollo tumoral detectado en estos animales. Estas células $T\gamma\delta$, junto con los macrófagos y las células T reguladoras, son consideradas los mayores elementos inmunosupresores empleados por los tumores (Nestle, Di Meglio et al. 2009, Doedens, Stockmann et al. 2010, DeNardo, Brennan et al. 2011, Hanahan and Coussens 2012). En los ganglios submaxilares de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21$ hemos detectado el incremento de una de las poblaciones celulares más inmunosupresoras, las Células Supresoras de Derivación Mieloide (CSDMs) $Gr1+CD11b+CD49d+$, y no hemos detectado células de carácter citotóxico, lo indica que los tumores orales encontrados en los ratones $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ están sometidos a procesos de inmunosupresión. En un futuro sería interesante tratar de bloquear esta inmunosupresión, con el fin de estudiar sus efectos en el desarrollo y evolución de los tumores orales citados. Dado que CXCL1 y CXCL2 se encuentran aumentadas en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, una posible estrategia sería emplear inhibidores de CXCR2, receptor de CXCL1 y CXCL2, ya que se ha descrito que el bloqueo de CXCR2, mediante el uso de antagonistas, disminuye la población de las CSDMs $Gr1+CD11b+$, disminuyendo la inmunosupresión, e incluso limitando la diseminación del tumor (Acharyya, Oskarsson et al. 2012).

En su conjunto, estos resultados indicarían que p21 se comporta como un supresor tumoral en ausencia de pRb en epidermis, y pone de manifiesto la importancia de p21 y pRb en el desarrollo tumoral epidérmico.

La deficiencia de pRb y p21 como modelo de desarrollo de tumores orales de buen pronóstico.

El espectro tumoral observado en los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} junto con los estudios transcriptómicos realizados, apoyan la hipótesis de un papel funcional de pRb y p21 en el desarrollo de CECyC y tumorigénesis oral. Se han descrito recientemente las mutaciones implicadas en el desarrollo de este tipo de tumores (Agrawal, Frederick et al. 2011, Stransky, Egloff et al. 2011, Lui, Hedberg et al. 2013, Pickering, Zhang et al. 2013), y aunque no se han encontrado mutaciones en el gen *CDKN1A* y en un número muy limitado para *RB1* (Jithesh, Risk et al. 2013, Gaykalova, Mambo et al. 2014), existen evidencias indirectas que pueden sustentar esta hipótesis. Primero, pRb está inactivado funcionalmente en la mayoría de los tumores, incluidos los CECyC (Chung and Gillison 2009), probablemente mediante la amplificación de ciclina D1 y la inactivación de *Cdkn2a* (Agrawal, Frederick et al. 2011, Stransky, Egloff et al. 2011, Lui, Hedberg et al. 2013, Pickering, Zhang et al. 2013). La vía pRb/ciclinaD1 se encuentra alterada en los CECyC (Forastiere, Koch et al. 2001, Smeets, van der Plas et al. 2011). Además, p53 está mutado frecuentemente en estos tumores (Agrawal, Frederick et al. 2011, Stransky, Egloff et al. 2011, Lui, Hedberg et al. 2013, Pickering, Zhang et al. 2013), lo que puede conducir a una expresión alterada de p21 (Perez-Ordóñez, Beauchemin et al. 2006, Chung and Gillison 2009). Por otro lado, cabe señalar que en otros tipos de tumores humanos, las mutaciones en el gen *CDKN1A* se limitan a tumores de bajo grado y buen pronóstico (Cazier, Rao et al. 2014). En este sentido, sería preciso el análisis de un mayor número de CECyC de este tipo para poder determinar la posible incidencia de mutaciones en *CDKN1A* en esta clase de tumores. Finalmente, se debe considerar el papel de E7 y E6 de VPH en el desarrollo de CECyC, cuya actividad conduce a la degradación de la familia de Retinoblastoma y de p53 (véase más adelante).

Nuestros resultados muestran que los ratones pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} desarrollan carcinomas escamosos orales con una elevada frecuencia. Estos hallazgos son similares a los encontrados en los animales nulos para p107 en los que se induce la pérdida de pRb de forma condicional e inducible (Costa, Santos et al. 2012). Estos ratones desarrollan tumores espontáneos en áreas periorales y orales, como consecuencia de alteraciones en la vía de PTEN/Akt/mTOR (Costa, Santos et al. 2012). De forma análoga, nosotros hemos observado un aumento de actividad de Akt en varios tumores, indicando la posible implicación de la activación de la vía PTEN/Akt, y sugiriendo, como en el caso de la epidermis, la existencia de funciones similares para p107 y p21 en ausencia de pRb. Sin embargo, como ya hemos comentado en el apartado anterior, el

componente inflamatorio y la presencia de daño en el ADN detectado en los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, y no en $pRb^{\Delta Epi};p107^{-/-}$, es indicativo de funciones diferenciales para p21 y p107.

Respecto al papel de la activación de Akt en la carcinogénesis oral, nuestro grupo ha descrito que la sobreactivación de Akt en el epitelio oral de animales transgénicos da lugar a la aparición de tumores benignos (Segrelles, Lu et al. 2007), que aumentan en frecuencia y agresividad con la pérdida de p53, desarrollando incluso metástasis en nódulos linfáticos y pulmón (Moral, Segrelles et al. 2009). El proceso de cooperación parece asociarse a un proceso de senescencia prematura debido a la activación del oncogén *Akt*. Dicha senescencia prematura se acompaña de un incremento en los niveles de p53, de forma que la eliminación de p53 en este mismo tipo celular impide el desarrollo de la senescencia y conduce a un aumento en la agresividad de estos tumores (Moral, Segrelles et al. 2009). Sin embargo, no hemos detectado células senescentes ni en la piel de los animales $p21^{-/-}$, ni en la piel ni en los tumores de los animales $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ que pudiera suponer un freno al desarrollo tumoral (datos no mostrados). Cabe señalar al respecto, que la senescencia prematura mediada por una sobreactivación de ejes oncogénicos, es en determinados casos dependiente de pRb y/o de p21 (Haferkamp, Tran et al. 2009, Thaler, Hahnel et al. 2009, Jeanblanc, Ragu et al. 2012).

El análisis bioquímico de lesiones tumorales en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, muestra también una activación de la vía de MAPKs, como lo demuestra el incremento de los niveles de las formas activas de Erk. Curiosamente, el incremento en la actividad de esta vía sólo se observa en las muestras donde no se detecta un incremento en la actividad de Akt/S6. Esto podría indicar un papel exclusivo para cada una de estas vías en el desarrollo tumoral. Se han reportado datos similares que demuestran la interconexión de las vías PI3K/Akt/mTOR y Raf-MEK-ERK mediante bucles de convergencia y retroalimentación, así como, de la activación de una de estas vías como consecuencia de la inhibición de la otra (Saini, Loi et al. 2013, Dent 2014). Esto puede tener importantes repercusiones clínicas, ya que por ejemplo, se ha visto que en pacientes tratados con inhibidores de cRaf, se produce un aumento en la aparición de CCEs ligado a un aumento de Akt (Aoki, Ogawa et al. 2004).

Otra de las vías que observamos activada es la vía de NFκB y Stat3. Ambas vías de señalización juegan un papel clave en el desarrollo de CECyC (Squarize, Castilho et al. 2006, Ferris and Grandis 2007). Se sabe, que mientras en los epitelios orales de individuos sanos la activación de Stat3 se detecta únicamente en la capa basal del epitelio oral, en las zonas

tumorales esta expresión se expande a todo el epitelio (Grandis, Drenning et al. 2000). Esta activación es mayor en los tumores indiferenciados, y se ha correlacionado con un peor pronóstico y con la presencia de metástasis en los nódulos linfáticos (Grandis, Drenning et al. 1998, Arany, Chen et al. 2003, Cheong, Chandramouli et al. 2009). El análisis inmunohistoquímico realizado en los tumores de lengua en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, mostró activación de Stat3 (determinada por la localización nuclear) en todo el epitelio tumoral, lo que contribuiría a la malignización. En este proceso, la activación de la vía de NF κ B, podría estar también contribuyendo al desarrollo de estos tumores orales (Squarize, Castilho et al. 2006). En CECyC, se ha observado que la amplificación y sobreactivación de EGFR parece ser la causa de la activación de las vías PI3K/Akt, MAPK/ERK y STAT3 (Ozanne, Richards et al. 1986, Grandis and Tweardy 1993, Kijima, Niwa et al. 2002, Leeman, Lui et al. 2006, Squarize, Castilho et al. 2006, Hama, Yuza et al. 2009, Uribe and Gonzalez 2011, Sun, Zhang et al. 2012), lo que ha conducido al diseño de nuevas aproximaciones terapéuticas (Cetuximab). Por tanto, en experimentos futuros sería interesante caracterizar posibles alteraciones del eje dependiente de EGFR en tumores de los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.

Está bien establecido, que la infección por el VPH puede inducir el desarrollo de subtipos específicos de CECyC asociados con un buen resultado clínico y caracterizados por patrones de expresión génica específicos (Pyeon, Newton et al. 2007). Estas características se han atribuido a la expresión de los dos principales oncogenes virales, E7 y E6 (Pyeon, Newton et al. 2007). Es importante destacar que la expresión de la oncoproteína viral E7 interfiere con pRb y con p21, lo que muestra un papel activo de estos dos supresores tumorales en la prevención de los tumores epiteliales (Chung and Gillison 2009, Shin, Balsitis et al. 2009, Leemans, Braakhuis et al. 2011). Por otra parte, se sabe que el oncogén E6 del VPH favorece la degradación de p53, lo que interfiere con la expresión de p21. Sin embargo, se ha descrito recientemente en injertos de piel artificial humana, obtenida a partir de queratinocitos primarios que expresan la proteína E7, que la expresión de la oncoproteína E7 produce un incremento en la expresión del gen de p21 (Buitrago-Perez, Garaulet et al. 2009). Los análisis de perfiles de expresión génica, realizados a partir de estos injertos, muestran un solapamiento significativo en la expresión de ARNm y ARNm_i con las lesiones pretumorales y tumorales asociadas a infecciones por VPH (Buitrago-Perez, Garaulet et al. 2009). Dada la relevancia del VPH en el desarrollo de CECyC, todas estas observaciones serán investigadas en un futuro con el propósito de identificar las posibles similitudes y diferencias potenciales entre los tumores $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los CECyC humanos positivos para VPH, como previamente se ha descrito (Buitrago-Perez, Garaulet et al. 2009).

En conjunto, los resultados obtenidos de los análisis de los tumores orales del ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, los define predominantemente como bien diferenciados y no agresivos. De hecho, los estudios comparativos del transcriptoma demostraron similitudes significativas entre los genes desregulados en los ratones $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ y los genes alterados en los CECyC humanos caracterizados como de buen pronóstico. En este sentido, en los CECyC humanos más agresivos se observa una disminución en la expresión de los genes que presentan una expresión aumentada en los animales $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, lo que corrobora que los tumores CECyC encontrados en el ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ son de buen pronóstico. Además, la firma común humano-múrida permite clasificar a los pacientes en dos grupos en base a su supervivencia, esto sugiere que los pacientes con peor pronóstico son aquellos que muestran una expresión disminuida de los genes con expresión aumentada en el ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$. Esta firma génica humano-múrida, tendría utilidad en estudios clínicos en aquellos casos en los que se disponga de datos de expresión génica de muestras de pacientes, ya que podría predecir la sensibilidad o resistencia a un tratamiento determinado, tal y como predicen los datos de expresión génica y sensibilidad a inhibidores específicos encontrados.

Dada la baja supervivencia global del CECyC humano, y a pesar del avance en cuanto a terapias (Chin, Boyle et al. 2006), es necesario el desarrollo de nuevas herramientas de estudio que permitan el progreso en el tratamiento de esta enfermedad. Somos conscientes de que la elevada mortalidad/letalidad del modelo convencional de ratón $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$, dificulta su utilización como instrumento de estudio. No obstante, el trabajo presentado en esta tesis abre la posibilidad de desarrollar aproximaciones alternativas como la generación de modelos doble deficientes en pRb y $p21$ de tipo condicionales o inducibles, que podrían utilizarse para el estudio del desarrollo CECyC, y para ensayos preclínicos *in vivo* y/o *in vitro*, permitiendo testar la especificidad de fármacos diseñados para terapia tumoral o para la quimioprevención, ya que uno de los principales problemas que existe hoy en día en los pacientes con tumores orales, es la fuerte recurrencia de la enfermedad.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis muestran el relevante papel de $p21$ y pRb en la regulación de importantes procesos epiteliales, pone de manifiesto sus distintas implicaciones en el desarrollo tumoral, y abre la posibilidad a la generación de nuevos modelos animales para el estudio de esta patología, y su posible utilización para el testado de drogas terapéuticas.

CONCLUSIONES

- 1.- La deficiencia en pRb y p21 en la epidermis da lugar a un fenotipo caracterizado por una severa hiperplasia e hiperqueratosis y una paraqueratosis. Este fenotipo es más acusado que el observado en los animales deficientes en pRb, y es consecuencia de las alteraciones en los procesos de proliferación y diferenciación, confirmando la existencia de una cooperación funcional entre pRb y p21 en este tejido.
- 2.- En la epidermis, la ausencia de pRb y p21 da lugar a folículos pilosos anómalos y a un descenso en la población de células madre foliculares K15+ y CD34+. En estos animales se observa la aparición de heridas espontáneas que tardan en cicatrizar.
- 3.- En los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} se origina una respuesta inflamatoria caracterizada por alteraciones en los niveles de citoquinas y quimioquinas. El aumento de actividad de NFκB y Stat3 es previo al fenotipo inflamatorio.
- 4.- En la epidermis de los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} se detecta la producción de daño en el ADN. Este daño genómico conduce a la inducción/activación del eje p53/ATR/CHK1. Sin embargo, pese a la inducción de p53, no se observan signos de apoptosis.
- 5.- En los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} se produce la aparición de tumores espontáneos de origen epitelial.
- 6.- La ausencia de pRb y p21 produce aumento en la actividad y cambios en la expresión de los factores de transcripción E2F, y conduce a una desregulación génica que afecta a las vías moleculares de Hedgehog, Notch, Wnt/β-catenina, y a la expresión de ΔNp63.
- 7.- Los tumores detectados en los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} son mayoritariamente CCEs diferenciados que afectan principalmente a la lengua y a los tejidos orales, y presentan activación de las vías moleculares PI3K/Akt, Stat3 y MAPKs.
- 8.- El transcriptoma de la piel de los animales pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} presenta similitudes significativas con el detectado en los CECyC humanos de buen pronóstico. Estos datos unidos a los procedentes de los análisis histopatológicos, indican que estos animales podrían suponer un modelo útil para el estudio de esta patología.

REFERENCIAS

- Abbas, T. and A. Dutta (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." Nat Rev Cancer **9**(6): 400-414.
- Acharyya, S., T. Oskarsson, S. Vanharanta, S. Malladi, J. Kim, P. G. Morris, K. Manova-Todorova, M. Leversha, N. Hogg, V. E. Seshan, L. Norton, E. Brogi and J. Massague (2012). "A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis." Cell **150**(1): 165-178.
- Adorno, M., M. Cordenonsi, M. Montagner, S. Dupont, C. Wong, B. Hann, A. Solari, S. Bobisse, M. B. Rondina, V. Guzzardo, A. R. Parenti, A. Rosato, S. Bicciato, A. Balmain and S. Piccolo (2009). "A Mutant-p53/Smad complex opposes p63 to empower TGFbeta-induced metastasis." Cell **137**(1): 87-98.
- Afshari, C. A., M. A. Nichols, Y. Xiong and M. Mudryj (1996). "A role for a p21-E2F interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts." Cell Growth Differ **7**(8): 979-988.
- Agarwal, S., M. Mathur, N. K. Shukla and R. Ralhan (1998). "Expression of cyclin dependent kinase inhibitor p21waf1/cip1 in premalignant and malignant oral lesions: relationship with p53 status." Oral Oncol **34**(5): 353-360.
- Agrawal, N., M. J. Frederick, C. R. Pickering, C. Bettegowda, K. Chang, R. J. Li, C. Fakhry, T. X. Xie, J. Zhang, J. Wang, N. Zhang, A. K. El-Naggar, S. A. Jasser, J. N. Weinstein, L. Trevino, J. A. Drummond, D. M. Muzny, Y. Wu, L. D. Wood, R. H. Hruban, W. H. Westra, W. M. Koch, J. A. Califano, R. A. Gibbs, D. Sidransky, B. Vogelstein, V. E. Velculescu, N. Papadopoulos, D. A. Wheeler, K. W. Kinzler and J. N. Myers (2011). "Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1." Science **333**(6046): 1154-1157.
- Aguilar-Lemarroy, A., P. Gariglio, N. J. Whitaker, S. T. Eichhorst, H. zur Hausen, P. H. Krammer and F. Rosl (2002). "Restoration of p53 expression sensitizes human papillomavirus type 16 immortalized human keratinocytes to CD95-mediated apoptosis." Oncogene **21**(2): 165-175.
- Alonso, L. and E. Fuchs (2003). "Stem cells of the skin epithelium." Proc Natl Acad Sci U S A **100 Suppl 1**: 11830-11835.
- Alt, J. R., A. B. Gladden and J. A. Diehl (2002). "p21(Cip1) Promotes cyclin D1 nuclear accumulation via direct inhibition of nuclear export." J Biol Chem **277**(10): 8517-8523.
- Amornphimoltham, P., V. Sriuranpong, V. Patel, F. Benavides, C. J. Conti, J. Sauk, E. A. Sausville, A. A. Molinolo and J. S. Gutkind (2004). "Persistent activation of the Akt pathway in head and neck squamous cell carcinoma: a potential target for UCN-01." Clin Cancer Res **10**(12 Pt 1): 4029-4037.
- Aoki, K., T. Ogawa, Y. Ito and S. Nakashima (2004). "Cisplatin activates survival signals in UM-SCC-23 squamous cell carcinoma and these signal pathways are amplified in cisplatin-resistant squamous cell carcinoma." Oncol Rep **11**(2): 375-379.
- Arany, I., S. H. Chen, J. K. Megyesi, K. Adler-Storthz, Z. Chen, S. Rajaraman, I. A. Ember, S. K. Tying and M. M. Brysk (2003). "Differentiation-dependent expression of signal transducers and activators of transcription (STATs) might modify responses to growth factors in the cancers of the head and neck." Cancer Lett **199**(1): 83-89.
- Arias, C. F., A. Ballesteros-Tato, M. I. Garcia, J. Martin-Caballero, J. M. Flores, A. C. Martinez and D. Balomenos (2007). "p21CIP1/WAF1 controls proliferation of activated/memory T cells and affects homeostasis and memory T cell responses." J Immunol **178**(4): 2296-2306.

- Arnold, I. and F. M. Watt (2001). "c-Myc activation in transgenic mouse epidermis results in mobilization of stem cells and differentiation of their progeny." Curr Biol **11**(8): 558-568.
- Arwert, E. N., E. Hoste and F. M. Watt "Epithelial stem cells, wound healing and cancer." Nat Rev Cancer **12**(3): 170-180.
- Ashkenazi, A. and V. M. Dixit (1998). "Death receptors: signaling and modulation." Science **281**(5381): 1305-1308.
- Bailey, S. L., K. E. Gurley, K. Hoon-Kim, K. S. Kelly-Spratt and C. J. Kemp (2008). "Tumor suppression by p53 in the absence of Atm." Mol Cancer Res **6**(7): 1185-1192.
- Balentien, E., B. E. Mufson, R. L. Shattuck, R. Derynck and A. Richmond (1991). "Effects of MGSA/GRO alpha on melanocyte transformation." Oncogene **6**(7): 1115-1124.
- Balomenos, D., J. Martin-Caballero, M. I. Garcia, I. Prieto, J. M. Flores, M. Serrano and A. C. Martinez (2000). "The cell cycle inhibitor p21 controls T-cell proliferation and sex-linked lupus development." Nat Med **6**(2): 171-176.
- Barboza, J. A., G. Liu, Z. Ju, A. K. El-Naggar and G. Lozano (2006). "p21 delays tumor onset by preservation of chromosomal stability." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(52): 19842-19847.
- Bartek, J. and J. Lukas (2003). "Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer." Cancer Cell **3**(5): 421-429.
- Bartkova, J., Z. Horejsi, K. Koed, A. Kramer, F. Tort, K. Zieger, P. Guldberg, M. Sehested, J. M. Nesland, C. Lukas, T. Orntoft, J. Lukas and J. Bartek (2005). "DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis." Nature **434**(7035): 864-870.
- Basile, J. R., A. Eichten, V. Zacny and K. Munger (2003). "NF-kappaB-mediated induction of p21(Cip1/Waf1) by tumor necrosis factor alpha induces growth arrest and cytoprotection in normal human keratinocytes." Mol Cancer Res **1**(4): 262-270.
- Blanpain, C. and E. Fuchs (2006). "Epidermal stem cells of the skin." Annu Rev Cell Dev Biol **22**: 339-373.
- Blanpain, C., V. Horsley and E. Fuchs (2007). "Epithelial stem cells: turning over new leaves." Cell **128**(3): 445-458.
- Bolstad, B. M., R. A. Irizarry, M. Astrand and T. P. Speed (2003). "A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias." Bioinformatics **19**(2): 185-193.
- Bonnet, D. and J. E. Dick (1997). "Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell." Nat Med **3**(7): 730-737.
- Bornachea, O., M. Santos, A. B. Martinez-Cruz, R. Garcia-Escudero, M. Duenas, C. Costa, C. Segrelles, C. Lorz, A. Buitrago, C. Saiz-Ladera, X. Agirre, T. Grande, B. Paradela, A. Maraver, J. M. Ariza, F. Prosper, M. Serrano, M. Sanchez-Céspedes and J. M. Paramio (2012). "EMT and induction of miR-21 mediate metastasis development in Trp53-deficient tumours." Sci Rep **2**: 434.

- Bosch, A., K. Panoutsopoulou, J. M. Corominas, R. Gimeno, G. Moreno-Bueno, J. Martin-Caballero, S. Morales, T. Lobato, C. Martinez-Romero, E. F. Farias, X. Mayol, A. Cano and I. Hernandez-Munoz (2014). "The Polycomb group protein RING1B is overexpressed in ductal breast carcinoma and is required to sustain FAK steady state levels in breast cancer epithelial cells." *Oncotarget* **5**(8): 2065-2076.
- Brash, D. E., J. A. Rudolph, J. A. Simon, A. Lin, G. J. McKenna, H. P. Baden, A. J. Halperin and J. Ponten (1991). "A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma." *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22): 10124-10128.
- Brocke-Heidrich, K., A. K. Kretzschmar, G. Pfeifer, C. Henze, D. Löffler, D. Koczan, H. J. Thiesen, R. Burger, M. Gramatzki and F. Horn (2004). "Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation." *Blood* **103**(1): 242-251.
- Brown, E. J. and D. Baltimore (2000). "ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality." *Genes Dev* **14**(4): 397-402.
- Brugarolas, J., R. T. Bronson and T. Jacks (1998). "p21 is a critical CDK2 regulator essential for proliferation control in Rb-deficient cells." *J Cell Biol* **141**(2): 503-514.
- Brugarolas, J., C. Chandrasekaran, J. I. Gordon, D. Beach, T. Jacks and G. J. Hannon (1995). "Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency." *Nature* **377**(6549): 552-557.
- Brugarolas, J., K. Moberg, S. D. Boyd, Y. Taya, T. Jacks and J. A. Lees (1999). "Inhibition of cyclin-dependent kinase 2 by p21 is necessary for retinoblastoma protein-mediated G1 arrest after gamma-irradiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(3): 1002-1007.
- Buitrago-Perez, A., G. Garaulet, A. Vazquez-Carballo, J. M. Paramio and R. Garcia-Escudero (2009). "Molecular Signature of HPV-Induced Carcinogenesis: pRb, p53 and Gene Expression Profiling." *Curr Genomics* **10**(1): 26-34.
- Burkhardt, D. L. and J. Sage (2008). "Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene." *Nat Rev Cancer* **8**(9): 671-682.
- Carnero, A. and D. H. Beach (2004). "Absence of p21WAF1 cooperates with c-myc in bypassing Ras-induced senescence and enhances oncogenic cooperation." *Oncogene* **23**(35): 6006-6011.
- Caulin, C., T. Nguyen, G. A. Lang, T. M. Goepfert, B. R. Brinkley, W. W. Cai, G. Lozano and D. R. Roop (2007). "An inducible mouse model for skin cancer reveals distinct roles for gain- and loss-of-function p53 mutations." *J Clin Invest* **117**(7): 1893-1901.
- Cazier, J. B., S. R. Rao, C. M. McLean, A. L. Walker, B. J. Wright, E. E. Jaeger, C. Kartsonaki, L. Marsden, C. Yau, C. Camps, P. Kaisaki, W. G. S. C. Oxford-Illumina, J. Taylor, J. W. Catto, I. P. Tomlinson, A. E. Kiltie and F. C. Hamdy (2014). "Whole-genome sequencing of bladder cancers reveals somatic CDKN1A mutations and clinicopathological associations with mutation burden." *Nat Commun* **5**: 3756.
- Cazzalini, O., A. I. Scovassi, M. Savio, L. A. Stivala and E. Prosperi (2010). "Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response." *Mutat Res* **704**(1-3): 12-20.

- Cimprich, K. A. and D. Cortez (2008). "ATR: an essential regulator of genome integrity." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 616-627.
- Clarke, A. R., E. R. Maandag, M. van Roon, N. M. van der Lugt, M. van der Valk, M. L. Hooper, A. Berns and H. te Riele (1992). "Requirement for a functional Rb-1 gene in murine development." Nature **359**(6393): 328-330.
- Classon, M. and N. Dyson (2001). "p107 and p130: versatile proteins with interesting pockets." Exp Cell Res **264**(1): 135-147.
- Classon, M. and E. Harlow (2002). "The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer." Nat Rev Cancer **2**(12): 910-917.
- Claudio, P. P., P. Stiegler, C. M. Howard, C. Bellan, C. Minimo, G. M. Tosi, J. Rak, A. Kovatich, P. De Fazio, P. Micheli, M. Caputi, L. Leoncini, R. Kerbel, G. G. Giordano and A. Giordano (2001). "RB2/p130 gene-enhanced expression down-regulates vascular endothelial growth factor expression and inhibits angiogenesis in vivo." Cancer Res **61**(2): 462-468.
- Clevers, H. (2006). "Wnt/beta-catenin signaling in development and disease." Cell **127**(3): 469-480.
- Colmont, C. S., K. G. Harding, V. Piguet and G. K. Patel (2012). "Human skin cancer stem cells: a tale of mice and men." Exp Dermatol **21**(8): 576-580.
- Condorelli, G. L., U. Testa, M. Valtieri, L. Vitelli, A. De Luca, T. Barberi, E. Montesoro, S. Campisi, A. Giordano and C. Peschle (1995). "Modulation of retinoblastoma gene in normal adult hematopoiesis: peak expression and functional role in advanced erythroid differentiation." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(11): 4808-4812.
- Costa, C., J. M. Paramio and M. Santos (2013). "Skin Tumors Rb(eing) Uncovered." Front Oncol **3**: 307.
- Costa, C., M. Santos, C. Segrelles, M. Duenas, M. F. Lara, X. Agirre, F. Prosper, R. Garcia-Escudero and J. M. Paramio (2012). "A novel tumor suppressor network in squamous malignancies." Sci Rep **2**: 828.
- Cotsarelis, G. (2006). "Epithelial stem cells: a folliculocentric view." J Invest Dermatol **126**(7): 1459-1468.
- Cotsarelis, G., P. Kaur, D. Dhouailly, U. Hengge and J. Bickenbach (1999). "Epithelial stem cells in the skin: definition, markers, localization and functions." Exp Dermatol **8**(1): 80-88.
- Cotsarelis, G., T. T. Sun and R. M. Lavker (1990). "Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit: implications for follicular stem cells, hair cycle, and skin carcinogenesis." Cell **61**(7): 1329-1337.
- Coussens, L. M. and Z. Werb (2002). "Inflammation and cancer." Nature **420**(6917): 860-867.
- Cromer, A., A. Carles, R. Millon, G. Ganguli, F. Chalmel, F. Lemaire, J. Young, D. Dembele, C. Thibault, D. Muller, O. Poch, J. Abecassis and B. Wasylyk (2004). "Identification of genes associated with tumorigenesis and metastatic potential of hypopharyngeal cancer by microarray analysis." Oncogene **23**(14): 2484-2498.

- Chen, H. Z., S. Y. Tsai and G. Leone (2009). "Emerging roles of E2Fs in cancer: an exit from cell cycle control." Nat Rev Cancer **9**(11): 785-797.
- Chen, P. L., P. Scully, J. Y. Shew, J. Y. Wang and W. H. Lee (1989). "Phosphorylation of the retinoblastoma gene product is modulated during the cell cycle and cellular differentiation." Cell **58**(6): 1193-1198.
- Cheong, S. C., G. V. Chandramouli, A. Saleh, R. B. Zain, S. H. Lau, S. Sivakumaren, R. Pathmanathan, S. S. Prime, S. H. Teo, V. Patel and J. S. Gutkind (2009). "Gene expression in human oral squamous cell carcinoma is influenced by risk factor exposure." Oral Oncol **45**(8): 712-719.
- Chicas, A., X. Wang, C. Zhang, M. McCurrach, Z. Zhao, O. Mert, R. A. Dickins, M. Narita, M. Zhang and S. W. Lowe (2010). "Dissecting the unique role of the retinoblastoma tumor suppressor during cellular senescence." Cancer Cell **17**(4): 376-387.
- Chin, D., G. M. Boyle, S. Porceddu, D. R. Theile, P. G. Parsons and W. B. Coman (2006). "Head and neck cancer: past, present and future." Expert Rev Anticancer Ther **6**(7): 1111-1118.
- Choudhury, A. R., Z. Ju, M. W. Djojosebroto, A. Schienke, A. Lechel, S. Schaetzlein, H. Jiang, A. Stepczynska, C. Wang, J. Buer, H. W. Lee, T. von Zglinicki, A. Ganser, P. Schirmacher, H. Nakauchi and K. L. Rudolph (2007). "Cdkn1a deletion improves stem cell function and lifespan of mice with dysfunctional telomeres without accelerating cancer formation." Nat Genet **39**(1): 99-105.
- Chung, C. H. and M. L. Gillison (2009). "Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications." Clin Cancer Res **15**(22): 6758-6762.
- da Silva-Diz, V., S. Sole-Sanchez, A. Valdes-Gutierrez, M. Urpi, D. Riba-Artes, R. M. Penin, G. Pascual, E. Gonzalez-Suarez, O. Casanovas, F. Vinals, J. M. Paramio, E. Batlle and P. Munoz (2013). "Progeny of Lgr5-expressing hair follicle stem cell contributes to papillomavirus-induced tumor development in epidermis." Oncogene **32**(32): 3732-3743.
- Dannenberg, J. H., A. van Rossum, L. Schuijff and H. te Riele (2000). "Ablation of the retinoblastoma gene family deregulates G(1) control causing immortalization and increased cell turnover under growth-restricting conditions." Genes Dev **14**(23): 3051-3064.
- De Bosscher, K., M. L. Schmitz, W. Vanden Berghe, S. Plaisance, W. Fiers and G. Haegeman (1997). "Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor-kappaB-dependent transcription involves direct interference with transactivation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(25): 13504-13509.
- De Bosscher, K., W. Vanden Berghe and G. Haegeman (2003). "The interplay between the glucocorticoid receptor and nuclear factor-kappaB or activator protein-1: molecular mechanisms for gene repression." Endocr Rev **24**(4): 488-522.
- De la Cueva, E., I. Garcia-Cao, M. Herranz, P. Lopez, P. Garcia-Palencia, J. M. Flores, M. Serrano, J. Fernandez-Piqueras and J. Martin-Caballero (2006). "Tumorigenic activity of p21(Waf1/Cip1) in thymic lymphoma." Oncogene **25**(29): 4128-4132.
- DeNardo, D. G., D. J. Brennan, E. Rexhepaj, B. Ruffell, S. L. Shiao, S. F. Madden, W. M. Gallagher, N. Wadhwani, S. D. Keil, S. A. Junaid, H. S. Rugo, E. S. Hwang, K. Jirstrom, B. L. West

- and L. M. Coussens (2011). "Leukocyte complexity predicts breast cancer survival and functionally regulates response to chemotherapy." *Cancer Discov* **1**(1): 54-67.
- Deng, C., P. Zhang, J. W. Harper, S. J. Elledge and P. Leder (1995). "Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control." *Cell* **82**(4): 675-684.
- Dennis, G., Jr., B. T. Sherman, D. A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H. C. Lane and R. A. Lempicki (2003). "DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery." *Genome Biol* **4**(5): P3.
- Dent, P. (2014). "Crosstalk between ERK, AKT, and cell survival." *Cancer Biol Ther* **15**(3): 245-246.
- Devgan, V., N. Bach-Cuc, H. Oh and D. P. Dotto (2006). "p21Waf1/Cip1 suppresses keratinocyte differentiation independently of the cell cycle through transcriptional upregulation of the IGF-1 gene." *J Biol Chem*.
- Devgan, V., C. Mammucari, S. E. Millar, C. Briskin and G. P. Dotto (2005). "p21WAF1/Cip1 is a negative transcriptional regulator of Wnt4 expression downstream of Notch1 activation." *Genes Dev* **19**(12): 1485-1495.
- Di Cunto, F., G. Topley, E. Calautti, J. Hsiao, L. Ong, P. K. Seth and G. P. Dotto (1998). "Inhibitory function of p21Cip1/WAF1 in differentiation of primary mouse keratinocytes independent of cell cycle control." *Science* **280**(5366): 1069-1072.
- Di Maira, G., M. Salvi, G. Arrigoni, O. Marin, S. Sarno, F. Brustolon, L. A. Pinna and M. Ruzzene (2005). "Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB." *Cell Death Differ* **12**(6): 668-677.
- DiGiovanni, J. (1992). "Multistage carcinogenesis in mouse skin." *Pharmacol Ther* **54**(1): 63-128.
- Dimri, G. P., M. Nakanishi, P. Y. Desprez, J. R. Smith and J. Campisi (1996). "Inhibition of E2F activity by the cyclin-dependent protein kinase inhibitor p21 in cells expressing or lacking a functional retinoblastoma protein." *Mol Cell Biol* **16**(6): 2987-2997.
- Doedens, A. L., C. Stockmann, M. P. Rubinstein, D. Liao, N. Zhang, D. G. DeNardo, L. M. Coussens, M. Karin, A. W. Goldrath and R. S. Johnson (2010). "Macrophage expression of hypoxia-inducible factor-1 alpha suppresses T-cell function and promotes tumor progression." *Cancer Res* **70**(19): 7465-7475.
- Dotto, G. P. (2000). "p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle?" *Biochim Biophys Acta* **1471**(1): M43-56.
- Duenas, M., M. Santos, J. F. Aranda, C. Bielza, A. B. Martinez-Cruz, C. Lorz, M. Taron, E. M. Ciruelos, J. L. Rodriguez-Peralto, M. Martin, P. Larranaga, J. Dahabreh, G. P. Stathopoulos, R. Rosell, J. M. Paramio and R. Garcia-Escudero (2012). "Mouse p53-deficient cancer models as platforms for obtaining genomic predictors of human cancer clinical outcomes." *PLoS One* **7**(8): e42494.
- Dutta, J., Y. Fan, N. Gupta, G. Fan and C. Gelinas (2006). "Current insights into the regulation of programmed cell death by NF-kappaB." *Oncogene* **25**(51): 6800-6816.

- Dyson, N. (1998). "The regulation of E2F by pRB-family proteins." Genes Dev **12**(15): 2245-2262.
- Dyson, N., P. M. Howley, K. Munger and E. Harlow (1989). "The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product." Science **243**(4893): 934-937.
- el-Deiry, W. S., T. Tokino, V. E. Velculescu, D. B. Levy, R. Parsons, J. M. Trent, D. Lin, W. E. Mercer, K. W. Kinzler and B. Vogelstein (1993). "WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression." Cell **75**(4): 817-825.
- Estilo, C. L., O. c. P, S. Talbot, N. D. Socci, D. L. Carlson, R. Ghossein, T. Williams, Y. Yonekawa, Y. Ramanathan, J. O. Boyle, D. H. Kraus, S. Patel, A. R. Shaha, R. J. Wong, J. M. Hurn, J. P. Shah and B. Singh (2009). "Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis." BMC Cancer **9**: 11.
- Ewen, M. E., J. W. Ludlow, E. Marsilio, J. A. DeCaprio, R. C. Millikan, S. H. Cheng, E. Paucha and D. M. Livingston (1989). "An N-terminal transformation-governing sequence of SV40 large T antigen contributes to the binding of both p110Rb and a second cellular protein, p120." Cell **58**(2): 257-267.
- Ewen, M. E., Y. G. Xing, J. B. Lawrence and D. M. Livingston (1991). "Molecular cloning, chromosomal mapping, and expression of the cDNA for p107, a retinoblastoma gene product-related protein." Cell **66**(6): 1155-1164.
- Falck, J., N. Mailand, R. G. Syljuasen, J. Bartek and J. Lukas (2001). "The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis." Nature **410**(6830): 842-847.
- Fang, Y., C. C. Tsao, B. K. Goodman, R. Furumai, C. A. Tirado, R. T. Abraham and X. F. Wang (2004). "ATR functions as a gene dosage-dependent tumor suppressor on a mismatch repair-deficient background." EMBO J **23**(15): 3164-3174.
- Ferguson, K. L., J. L. Vanderluit, J. M. Hebert, W. C. McIntosh, E. Tibbo, J. G. MacLaurin, D. S. Park, V. A. Wallace, M. Vooijs, S. K. McConnell and R. S. Slack (2002). "Telencephalon-specific Rb knockouts reveal enhanced neurogenesis, survival and abnormal cortical development." EMBO J **21**(13): 3337-3346.
- Fernandez-Capetillo, O., H. T. Chen, A. Celeste, I. Ward, P. J. Romanienko, J. C. Morales, K. Naka, Z. Xia, R. D. Camerini-Otero, N. Motoyama, P. B. Carpenter, W. M. Bonner, J. Chen and A. Nussenzweig (2002). "DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1." Nat Cell Biol **4**(12): 993-997.
- Ferris, R. L. and J. R. Grandis (2007). "NF-kappaB gene signatures and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **13**(19): 5663-5664.
- Fiedler, W., G. Giaccone, P. Lasch, I. van der Horst, N. Brega, R. Courtney, A. Abbattista, D. R. Shalinsky, C. Bokemeyer and E. Boven (2011). "Phase I trial of SU14813 in patients with advanced solid malignancies." Ann Oncol **22**(1): 195-201.
- Forastiere, A., W. Koch, A. Trotti and D. Sidransky (2001). "Head and neck cancer." N Engl J Med **345**(26): 1890-1900.
- Ford, J. W. and D. W. McVicar (2009). "TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease." Curr Opin Immunol **21**(1): 38-46.

- Fragkos, M., J. Jurvensuu and P. Beard (2009). "H2AX is required for cell cycle arrest via the p53/p21 pathway." *Mol Cell Biol* **29**(10): 2828-2840.
- Franke, W. W., P. Cowin, M. Schmelz and H. P. Kapprell (1987). "The desmosomal plaque and the cytoskeleton." *Ciba Found Symp* **125**: 26-48.
- Franke, W. W., D. L. Schiller, R. Moll, S. Winter, E. Schmid, I. Engelbrecht, H. Denk, R. Krepler and B. Platzer (1981). "Diversity of cytokeratins. Differentiation specific expression of cytokeratin polypeptides in epithelial cells and tissues." *J Mol Biol* **153**(4): 933-959.
- Franklin, D. S., V. L. Godfrey, D. A. O'Brien, C. Deng and Y. Xiong (2000). "Functional collaboration between different cyclin-dependent kinase inhibitors suppresses tumor growth with distinct tissue specificity." *Mol Cell Biol* **20**(16): 6147-6158.
- Freudlsperger, C., J. R. Burnett, J. A. Friedman, V. R. Kannabiran, Z. Chen and C. Van Waes (2011). "EGFR-PI3K-AKT-mTOR signaling in head and neck squamous cell carcinomas: attractive targets for molecular-oriented therapy." *Expert Opin Ther Targets* **15**(1): 63-74.
- Fridman, W. H., M. C. Dieu-Nosjean, F. Pages, I. Cremer, D. Damotte, C. Sautes-Fridman and J. Galon "The immune microenvironment of human tumors: general significance and clinical impact." *Cancer Microenviron* **6**(2): 117-122.
- Friend, S. H., R. Bernards, S. Rogelj, R. A. Weinberg, J. M. Rapaport, D. M. Albert and T. P. Dryja (1986). "A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma." *Nature* **323**(6089): 643-646.
- Frierson, H. F., Jr., A. K. El-Naggar, J. B. Welsh, L. M. Sapinoso, A. I. Su, J. Cheng, T. Saku, C. A. Moskaluk and G. M. Hampton (2002). "Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma." *Am J Pathol* **161**(4): 1315-1323.
- Fuchs, E. and H. Green (1980). "Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte." *Cell* **19**(4): 1033-1042.
- Fuchs, E. and S. Raghavan (2002). "Getting under the skin of epidermal morphogenesis." *Nat Rev Genet* **3**(3): 199-209.
- Fung, Y. K., A. L. Murphree, A. T'Ang, J. Qian, S. H. Hinrichs and W. F. Benedict (1987). "Structural evidence for the authenticity of the human retinoblastoma gene." *Science* **236**(4809): 1657-1661.
- Funk, J. O., S. Waga, J. B. Harry, E. Espling, B. Stillman and D. A. Galloway (1997). "Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein." *Genes Dev* **11**(16): 2090-2100.
- Gabellini, C., D. Del Bufalo and G. Zupi (2006). "Involvement of RB gene family in tumor angiogenesis." *Oncogene* **25**(38): 5326-5332.
- Ganuza, M., C. Saiz-Ladera, M. Canamero, G. Gomez, R. Schneider, M. A. Blasco, D. Pisano, J. M. Paramio, D. Santamaria and M. Barbacid (2012). "Genetic inactivation of Cdk7 leads to cell cycle arrest and induces premature aging due to adult stem cell exhaustion." *EMBO J* **31**(11): 2498-2510.

- Garcia-Escudero, R., A. B. Martinez-Cruz, M. Santos, C. Lorz, C. Segrelles, G. Garaulet, C. Saiz-Ladera, C. Costa, A. Buitrago-Perez, M. Duenas and J. M. Paramio (2010). "Gene expression profiling of mouse p53-deficient epidermal carcinoma defines molecular determinants of human cancer malignancy." *Mol Cancer* **9**: 193.
- Garcia-Fernandez, R. A., P. Garcia-Palencia, M. A. Sanchez, G. Gil-Gomez, B. Sanchez, E. Rollan, J. Martin-Caballero and J. M. Flores (2011). "Combined loss of p21(waf1/cip1) and p27(kip1) enhances tumorigenesis in mice." *Lab Invest* **91**(11): 1634-1642.
- Garlich, J. R., P. De, N. Dey, J. D. Su, X. Peng, A. Miller, R. Murali, Y. Lu, G. B. Mills, V. Kundra, H. K. Shu, Q. Peng and D. L. Durden (2008). "A vascular targeted pan phosphoinositide 3-kinase inhibitor prodrug, SF1126, with antitumor and antiangiogenic activity." *Cancer Res* **68**(1): 206-215.
- Gartel, A. L. (2005). "The conflicting roles of the cdk inhibitor p21(CIP1/WAF1) in apoptosis." *Leuk Res* **29**(11): 1237-1238.
- Gartel, A. L. (2006). "Is p21 an oncogene?" *Mol Cancer Ther* **5**(6): 1385-1386.
- Gartel, A. L. and A. L. Tyner (1999). "Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene." *Exp Cell Res* **246**(2): 280-289.
- Gatei, M., K. Sloper, C. Sorensen, R. Syljuasen, J. Falck, K. Hobson, K. Savage, J. Lukas, B. B. Zhou, J. Bartek and K. K. Khanna (2003). "Ataxia-telangiectasia-mutated (ATM) and NBS1-dependent phosphorylation of Chk1 on Ser-317 in response to ionizing radiation." *J Biol Chem* **278**(17): 14806-14811.
- Gaykalova, D. A., E. Mambo, A. Choudhary, J. Houghton, K. Buddavarapu, T. Sanford, W. Darden, A. Adai, A. Hadd, G. Latham, L. V. Danilova, J. Bishop, R. J. Li, W. H. Westra, P. Hennessey, W. M. Koch, M. F. Ochs, J. A. Califano and W. Sun (2014). "Novel insight into mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma." *PLoS One* **9**(3): e93102.
- Ginos, M. A., G. P. Page, B. S. Michalowicz, K. J. Patel, S. E. Volker, S. E. Pambuccian, F. G. Ondrey, G. L. Adams and P. M. Gaffney (2004). "Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck." *Cancer Res* **64**(1): 55-63.
- Giordano, T. J., A. Y. Au, R. Kuick, D. G. Thomas, D. R. Rhodes, K. G. Wilhelm, Jr., M. Vinco, D. E. Misek, D. Sanders, Z. Zhu, R. Ciampi, S. Hanash, A. Chinnaiyan, R. J. Clifton-Bligh, B. G. Robinson, Y. E. Nikiforov and R. J. Koenig (2006). "Delineation, functional validation, and bioinformatic evaluation of gene expression in thyroid follicular carcinomas with the PAX8-PPARG translocation." *Clin Cancer Res* **12**(7 Pt 1): 1983-1993.
- Girardi, M., J. Lewis, E. Glusac, R. B. Filler, L. Geng, A. C. Hayday and R. E. Tigelaar (2002). "Resident skin-specific gammadelta T cells provide local, nonredundant regulation of cutaneous inflammation." *J Exp Med* **195**(7): 855-867.
- Girardi, M., D. E. Oppenheim, C. R. Steele, J. M. Lewis, E. Glusac, R. Filler, P. Hobby, B. Sutton, R. E. Tigelaar and A. C. Hayday (2001). "Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells." *Science* **294**(5542): 605-609.
- Goodrich, D. W. (2006). "The retinoblastoma tumor-suppressor gene, the exception that proves the rule." *Oncogene* **25**(38): 5233-5243.

- Gottifredi, V., K. McKinney, M. V. Poyurovsky and C. Prives (2004). "Decreased p21 levels are required for efficient restart of DNA synthesis after S phase block." J Biol Chem **279**(7): 5802-5810.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, A. Chakraborty, M. Y. Zhou, Q. Zeng, A. S. Pitt and D. J. Tweardy (1998). "Requirement of Stat3 but not Stat1 activation for epidermal growth factor receptor-mediated cell growth In vitro." J Clin Invest **102**(7): 1385-1392.
- Grandis, J. R., S. D. Drenning, Q. Zeng, S. C. Watkins, M. F. Melhem, S. Endo, D. E. Johnson, L. Huang, Y. He and J. D. Kim (2000). "Constitutive activation of Stat3 signaling abrogates apoptosis in squamous cell carcinogenesis in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(8): 4227-4232.
- Grandis, J. R. and D. J. Tweardy (1993). "TGF-alpha and EGFR in head and neck cancer." J Cell Biochem Suppl **17F**: 188-191.
- Graveland, A. P., P. J. Golusinski, M. Buijze, R. Douma, N. Sons, D. J. Kuik, E. Bloemena, C. R. Leemans, R. H. Brakenhoff and B. J. Braakhuis (2011). "Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma." Int J Cancer **128**(8): 1852-1859.
- Grubauer, G., K. R. Feingold, R. M. Harris and P. M. Elias (1989). "Lipid content and lipid type as determinants of the epidermal permeability barrier." J Lipid Res **30**(1): 89-96.
- Haferkamp, S., S. L. Tran, T. M. Becker, L. L. Scurr, R. F. Kefford and H. Rizos (2009). "The relative contributions of the p53 and pRb pathways in oncogene-induced melanocyte senescence." Aging (Albany NY) **1**(6): 542-556.
- Hagemann, T., F. Balkwill and T. Lawrence (2007). "Inflammation and cancer: a double-edged sword." Cancer Cell **12**(4): 300-301.
- Haile, L. A., T. F. Greten and F. Korangy "Immune suppression: the hallmark of myeloid derived suppressor cells." Immunol Invest **41**(6-7): 581-594.
- Halazonetis, T. D., V. G. Gorgoulis and J. Bartek (2008). "An oncogene-induced DNA damage model for cancer development." Science **319**(5868): 1352-1355.
- Hama, T., Y. Yuza, Y. Saito, O. u. J, S. Kondo, M. Okabe, H. Yamada, T. Kato, H. Moriyama, S. Kurihara and M. Urashima (2009). "Prognostic significance of epidermal growth factor receptor phosphorylation and mutation in head and neck squamous cell carcinoma." Oncologist **14**(9): 900-908.
- Hanahan, D. and L. M. Coussens (2012). "Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment." Cancer Cell **21**(3): 309-322.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." Cell **144**(5): 646-674.
- Hannon, G. J., D. Demetrick and D. Beach (1993). "Isolation of the Rb-related p130 through its interaction with CDK2 and cyclins." Genes Dev **7**(12A): 2378-2391.

- Hanson, E. M., V. K. Clements, P. Sinha, D. Ilkovitch and S. Ostrand-Rosenberg (2009). "Myeloid-derived suppressor cells down-regulate L-selectin expression on CD4+ and CD8+ T cells." J Immunol **183**(2): 937-944.
- Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi and S. J. Elledge (1993). "The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases." Cell **75**(4): 805-816.
- Harper, J. W. and S. J. Elledge (1996). "Cdk inhibitors in development and cancer." Curr Opin Genet Dev **6**(1): 56-64.
- Harvat, B. L., A. Wang, P. Seth and A. M. Jetten (1998). "Up-regulation of p27Kip1, p21WAF1/Cip1 and p16Ink4a is associated with, but not sufficient for, induction of squamous differentiation." J Cell Sci **111** (Pt 9): 1185-1196.
- Hauser, P. J., D. Agrawal, M. Flanagan and W. J. Pledger (1997). "The role of p27kip1 in the in vitro differentiation of murine keratinocytes." Cell Growth Differ **8**(2): 203-211.
- Hayden, M. S. and S. Ghosh (2008). "Shared principles in NF-kappaB signaling." Cell **132**(3): 344-362.
- He, H., K. Jazdzewski, W. Li, S. Liyanarachchi, R. Nagy, S. Volinia, G. A. Calin, C. G. Liu, K. Franssila, S. Suster, R. T. Kloos, C. M. Croce and A. de la Chapelle (2005). "The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(52): 19075-19080.
- Hennings, H., K. Holbrook, P. Steinert and S. Yuspa (1980). "Growth and differentiation of mouse epidermal cells in culture: effects of extracellular calcium." Curr Probl Dermatol **10**: 3-25.
- Hilgendorf, K. I., E. S. Leshchiner, S. Nedelcu, M. A. Maynard, E. Calo, A. Ianari, L. D. Walensky and J. A. Lees (2013). "The retinoblastoma protein induces apoptosis directly at the mitochondria." Genes Dev **27**(9): 1003-1015.
- Horowitz, J. M., D. W. Yandell, S. H. Park, S. Canning, P. Whyte, K. Buchkovich, E. Harlow, R. A. Weinberg and T. P. Dryja (1989). "Point mutational inactivation of the retinoblastoma antioncogene." Science **243**(4893): 937-940.
- Horsley, V., D. O'Carroll, R. Tooze, Y. Ohinata, M. Saitou, T. Obukhanych, M. Nussenzweig, A. Tarakhovsky and E. Fuchs (2006). "Blimp1 defines a progenitor population that governs cellular input to the sebaceous gland." Cell **126**(3): 597-609.
- Hosack, D. A., G. Dennis, Jr., B. T. Sherman, H. C. Lane and R. A. Lempicki (2003). "Identifying biological themes within lists of genes with EASE." Genome Biol **4**(10): R70.
- Hunter, A. M., E. C. LaCasse and R. G. Korneluk (2007). "The inhibitors of apoptosis (IAPs) as cancer targets." Apoptosis **12**(9): 1543-1568.
- Hutchin, M. E., M. S. Kariapper, M. Grachtchouk, A. Wang, L. Wei, D. Cummings, J. Liu, L. E. Michael, A. Glick and A. A. Dlugosz (2005). "Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle." Genes Dev **19**(2): 214-223.

- Iglesias-Bartolome, R., D. Martin and J. S. Gutkind (2013). "Exploiting the head and neck cancer oncogenome: widespread PI3K-mTOR pathway alterations and novel molecular targets." *Cancer Discov* **3**(7): 722-725.
- Inga, A., F. Storici, T. A. Darden and M. A. Resnick (2002). "Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence." *Mol Cell Biol* **22**(24): 8612-8625.
- Irizarry, R. A., B. Hobbs, F. Collin, Y. D. Beazer-Barclay, K. J. Antonellis, U. Scherf and T. P. Speed (2003). "Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data." *Biostatistics* **4**(2): 249-264.
- Ito, M., Y. Liu, Z. Yang, J. Nguyen, F. Liang, R. J. Morris and G. Cotsarelis (2005). "Stem cells in the hair follicle bulge contribute to wound repair but not to homeostasis of the epidermis." *Nat Med* **11**(12): 1351-1354.
- Jacks, T., A. Fazeli, E. M. Schmitt, R. T. Bronson, M. A. Goodell and R. A. Weinberg (1992). "Effects of an Rb mutation in the mouse." *Nature* **359**(6393): 295-300.
- Jackson, R. J., J. Adnane, D. Coppola, A. Cantor, S. M. Sebti and W. J. Pledger (2002). "Loss of the cell cycle inhibitors p21(Cip1) and p27(Kip1) enhances tumorigenesis in knockout mouse models." *Oncogene* **21**(55): 8486-8497.
- Jain, S., M. A. Watson, M. K. DeBenedetti, Y. Hiraki, J. F. Moley and J. Milbrandt (2004). "Expression profiles provide insights into early malignant potential and skeletal abnormalities in multiple endocrine neoplasia type 2B syndrome tumors." *Cancer Res* **64**(11): 3907-3913.
- Jameson, J. and W. L. Havran (2007). "Skin gammadelta T-cell functions in homeostasis and wound healing." *Immunol Rev* **215**: 114-122.
- Jang, Y. N. and E. J. Baik (2013). "JAK-STAT pathway and myogenic differentiation." *JAKSTAT* **2**(2): e23282.
- Jeanblanc, M., S. Ragu, C. Gey, K. Contrepais, R. Courbeyrette, J. Y. Thuret and C. Mann (2012). "Parallel pathways in RAF-induced senescence and conditions for its reversion." *Oncogene* **31**(25): 3072-3085.
- Jithesh, P. V., J. M. Risk, A. G. Schache, J. Dhanda, B. Lane, T. Liloglou and R. J. Shaw (2013). "The epigenetic landscape of oral squamous cell carcinoma." *Br J Cancer* **108**(2): 370-379.
- Johnson, D. G. and R. Schneider-Broussard (1998). "Role of E2F in cell cycle control and cancer." *Front Biosci* **3**: d447-448.
- Johnson, M., D. Dimitrov, P. J. Vojta, J. C. Barrett, A. Noda, O. M. Pereira-Smith and J. R. Smith (1994). "Evidence for a p53-independent pathway for upregulation of SDI1/CIP1/WAF1/p21 RNA in human cells." *Mol Carcinog* **11**(2): 59-64.
- Jost, M., C. Kari and U. Rodeck (2000). "The EGF receptor - an essential regulator of multiple epidermal functions." *Eur J Dermatol* **10**(7): 505-510.
- Karin, M. (2006). "Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression." *Nature* **441**(7092): 431-436.

- Karin, M. and M. Delhase (2000). "The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling." Semin Immunol **12**(1): 85-98.
- Karin, M. and F. R. Greten (2005). "NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." Nat Rev Immunol **5**(10): 749-759.
- Kasper, M., V. Jaks, A. Are, A. Bergstrom, A. Schwager, J. Svard, S. Teglund, N. Barker and R. Toftgard (2011). "Wounding enhances epidermal tumorigenesis by recruiting hair follicle keratinocytes." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(10): 4099-4104.
- Keyes, W. M., M. Pecoraro, V. Aranda, E. Verneris-Lindahl, W. Li, H. Vogel, X. Guo, E. L. Garcia, T. V. Michurina, G. Enikolopov, S. K. Muthuswamy and A. A. Mills (2011). "DeltaNp63alpha is an oncogene that targets chromatin remodeler Lsh to drive skin stem cell proliferation and tumorigenesis." Cell Stem Cell **8**(2): 164-176.
- Khidr, L. and P. L. Chen (2006). "RB, the conductor that orchestrates life, death and differentiation." Oncogene **25**(38): 5210-5219.
- Kijima, T., H. Niwa, R. A. Steinman, S. D. Drenning, W. E. Gooding, A. L. Wentzel, S. Xi and J. R. Grandis (2002). "STAT3 activation abrogates growth factor dependence and contributes to head and neck squamous cell carcinoma tumor growth in vivo." Cell Growth Differ **13**(8): 355-362.
- King, K. E., L. Ha, T. Camilli and W. C. Weinberg (2013). "Delineating Molecular Mechanisms of Squamous Tissue Homeostasis and Neoplasia: Focus on p63." J Skin Cancer **2013**: 632028.
- King, K. E. and W. C. Weinberg (2007). "p63: defining roles in morphogenesis, homeostasis, and neoplasia of the epidermis." Mol Carcinog **46**(8): 716-724.
- Kitaura, H., M. Shinshi, Y. Uchikoshi, T. Ono, S. M. Iguchi-Arigo and H. Ariga (2000). "Reciprocal regulation via protein-protein interaction between c-Myc and p21(cip1/waf1/sdi1) in DNA replication and transcription." J Biol Chem **275**(14): 10477-10483.
- Kobielak, K., N. Stokes, J. de la Cruz, L. Polak and E. Fuchs (2007). "Loss of a quiescent niche but not follicle stem cells in the absence of bone morphogenetic protein signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(24): 10063-10068.
- Komarova, E. A., V. Krivokrysenko, K. Wang, N. Neznanov, M. V. Chernov, P. G. Komarov, M. L. Brennan, T. V. Golovkina, O. W. Rokhlin, D. V. Kuprash, S. A. Nedospasov, S. L. Hazen, E. Feinstein and A. V. Gudkov (2005). "p53 is a suppressor of inflammatory response in mice." Faseb J **19**(8): 1030-1032.
- Koster, M. I., D. Dai, B. Marinari, Y. Sano, A. Costanzo, M. Karin and D. R. Roop (2007). "p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(9): 3255-3260.
- Koster, M. I. and D. R. Roop (2004). "The role of p63 in development and differentiation of the epidermis." J Dermatol Sci **34**(1): 3-9.
- Kryczek, I., S. Wei, L. Zou, G. Zhu, P. Mottram, H. Xu, L. Chen and W. Zou (2006). "Cutting edge: induction of B7-H4 on APCs through IL-10: novel suppressive mode for regulatory T cells." J Immunol **177**(1): 40-44.

- Kyng, K. J., A. May, T. Stevnsner, K. G. Becker, S. Kolvra and V. A. Bohr (2005). "Gene expression responses to DNA damage are altered in human aging and in Werner Syndrome." Oncogene **24**(32): 5026-5042.
- LaBaer, J., M. D. Garrett, L. F. Stevenson, J. M. Slingerland, C. Sandhu, H. S. Chou, A. Fattaey and E. Harlow (1997). "New functional activities for the p21 family of CDK inhibitors." Genes Dev **11**(7): 847-862.
- Lachmann, A., H. Xu, J. Krishnan, S. I. Berger, A. R. Mazloom and A. Ma'ayan (2010). "ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments." Bioinformatics **26**(19): 2438-2444.
- Laird, P. W., A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch and A. Berns (1991). "Simplified mammalian DNA isolation procedure." Nucleic Acids Res **19**(15): 4293.
- Lara, M. F., R. Garcia-Escudero, S. Ruiz, M. Santos, M. Moral, A. B. Martinez-Cruz, C. Segrelles, C. Lorz and J. M. Paramio (2008). "Gene profiling approaches help to define the specific functions of retinoblastoma family in epidermis." Mol Carcinog **47**(3): 209-221.
- Lara, M. F. and J. M. Paramio (2007). "The Rb family connects with the Tp53 family in skin carcinogenesis." Mol Carcinog **46**(8): 618-623.
- Lara, M. F., M. Santos, S. Ruiz, C. Segrelles, M. Moral, A. B. Martinez-Cruz, P. Hernandez, J. Martinez-Palacio, C. Lorz, R. Garcia-Escudero and J. M. Paramio (2008). "p107 acts as a tumor suppressor in pRb-deficient epidermis." Mol Carcinog **47**(2): 105-113.
- Larcher, F., C. Bauluz, M. Diaz-Guerra, M. Quintanilla, C. J. Conti, C. Ballestin and J. L. Jorcano (1992). "Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas." Mol Carcinog **6**(2): 112-121.
- Lavker, R. M. and T. T. Sun (1983). "Epidermal stem cells." J Invest Dermatol **81**(1 Suppl): 121s-127s.
- Lawrence, M. S., P. Stojanov, C. H. Mermel, J. T. Robinson, L. A. Garraway, T. R. Golub, M. Meyerson, S. B. Gabriel, E. S. Lander and G. Getz "Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types." Nature **505**(7484): 495-501.
- Lee, E. Y., H. Cam, U. Ziebold, J. B. Rayman, J. A. Lees and B. D. Dynlacht (2002). "E2F4 loss suppresses tumorigenesis in Rb mutant mice." Cancer Cell **2**(6): 463-472.
- Lee, E. Y., C. Y. Chang, N. Hu, Y. C. Wang, C. C. Lai, K. Herrup, W. H. Lee and A. Bradley (1992). "Mice deficient for Rb are nonviable and show defects in neurogenesis and haematopoiesis." Nature **359**(6393): 288-294.
- Lee, W. H., J. Y. Shew, F. D. Hong, T. W. Sery, L. A. Donoso, L. J. Young, R. Bookstein and E. Y. Lee (1987). "The retinoblastoma susceptibility gene encodes a nuclear phosphoprotein associated with DNA binding activity." Nature **329**(6140): 642-645.
- Leeman, R. J., V. W. Lui and J. R. Grandis (2006). "STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer." Expert Opin Biol Ther **6**(3): 231-241.
- Leemans, C. R., B. J. Braakhuis and R. H. Brakenhoff (2011). "The molecular biology of head and neck cancer." Nat Rev Cancer **11**(1): 9-22.

- Li, D., S. Yea, G. Dolios, J. A. Martignetti, G. Narla, R. Wang, M. J. Walsh and S. L. Friedman (2005). "Regulation of Kruppel-like factor 6 tumor suppressor activity by acetylation." Cancer Res **65**(20): 9216-9225.
- Li, Q. and I. M. Verma (2002). "NF-kappaB regulation in the immune system." Nat Rev Immunol **2**(10): 725-734.
- Lin, J. and D. I. Kutler (2013). "Why otolaryngologists need to be aware of Fanconi anemia." Otolaryngol Clin North Am **46**(4): 567-577.
- Lin, W. W. and M. Karin (2007). "A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer." J Clin Invest **117**(5): 1175-1183.
- Liu, S., W. R. Bishop and M. Liu (2003). "Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy." Drug Resist Updat **6**(4): 183-195.
- Liu, Y., S. E. Elf, Y. Miyata, G. Sashida, Y. Liu, G. Huang, S. Di Giandomenico, J. M. Lee, A. Deblasio, S. Menendez, J. Antipin, B. Reva, A. Koff and S. D. Nimer (2009). "p53 regulates hematopoietic stem cell quiescence." Cell Stem Cell **4**(1): 37-48.
- Liu, Y., S. Lyle, Z. Yang and G. Cotsarelis (2003). "Keratin 15 promoter targets putative epithelial stem cells in the hair follicle bulge." J Invest Dermatol **121**(5): 963-968.
- Liu, Y., N. Yeh, X. H. Zhu, M. Leversha, C. Cordon-Cardo, R. Ghossein, B. Singh, E. Holland and A. Koff (2007). "Somatic cell type specific gene transfer reveals a tumor-promoting function for p21(Waf1/Cip1)." EMBO J **26**(22): 4683-4693.
- Lohr, K., C. Moritz, A. Contente and M. Dobbstein (2003). "p21/CDKN1A mediates negative regulation of transcription by p53." J Biol Chem **278**(35): 32507-32516.
- Lopez-Contreras, A. J. and O. Fernandez-Capetillo (2010). "The ATR barrier to replication-born DNA damage." DNA Repair (Amst) **9**(12): 1249-1255.
- Lorz, C., R. Garcia-Escudero, C. Segrelles, M. I. Garin, J. M. Ariza, M. Santos, S. Ruiz, M. F. Lara, A. B. Martinez-Cruz, C. Costa, A. Buitrago-Perez, C. Saiz-Ladera, M. Duenas and J. M. Paramio (2010). "A functional role of RB-dependent pathway in the control of quiescence in adult epidermal stem cells revealed by genomic profiling." Stem Cell Rev **6**(2): 162-177.
- Lorz, C., C. Segrelles and J. M. Paramio (2009). "On the origin of epidermal cancers." Curr Mol Med **9**(3): 353-364.
- Lui, V. W., M. L. Hedberg, H. Li, B. S. Vangara, K. Pendleton, Y. Zeng, Y. Lu, Q. Zhang, Y. Du, B. R. Gilbert, M. Freilino, S. Sauerwein, N. D. Peyser, D. Xiao, B. Diergaarde, L. Wang, S. Chiosea, R. Seethala, J. T. Johnson, S. Kim, U. Duvvuri, R. L. Ferris, M. Romkes, T. Nukui, P. Kwok-Shing Ng, L. A. Garraway, P. S. Hammerman, G. B. Mills and J. R. Grandis (2013). "Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers." Cancer Discov **3**(7): 761-769.
- Lukas, C., J. Bartkova, L. Latella, J. Falck, N. Mailand, T. Schroeder, M. Sehested, J. Lukas and J. Bartek (2001). "DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology." Cancer Res **61**(13): 4990-4993.

- Lyle, S., M. Christofidou-Solomidou, Y. Liu, D. E. Elder, S. Albelda and G. Cotsarelis (1998). "The C8/144B monoclonal antibody recognizes cytokeratin 15 and defines the location of human hair follicle stem cells." J Cell Sci **111 (Pt 21)**: 3179-3188.
- Macleod, K. F., N. Sherry, G. Hannon, D. Beach, T. Tokino, K. Kinzler, B. Vogelstein and T. Jacks (1995). "p53-dependent and independent expression of p21 during cell growth, differentiation, and DNA damage." Genes Dev **9**(8): 935-944.
- MacPherson, D., J. Sage, D. Crowley, A. Trumpp, R. T. Bronson and T. Jacks (2003). "Conditional mutation of Rb causes cell cycle defects without apoptosis in the central nervous system." Mol Cell Biol **23**(3): 1044-1053.
- Maeda, S., H. Kamata, J. L. Luo, H. Leffert and M. Karin (2005). "IKKbeta couples hepatocyte death to cytokine-driven compensatory proliferation that promotes chemical hepatocarcinogenesis." Cell **121**(7): 977-990.
- Maeda, S. and M. Omata (2008). "Inflammation and cancer: role of nuclear factor-kappaB activation." Cancer Sci **99**(5): 836-842.
- Mailand, N., A. V. Podtelejnikov, A. Groth, M. Mann, J. Bartek and J. Lukas (2002). "Regulation of G(2)/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability." EMBO J **21**(21): 5911-5920.
- Malanchi, I., H. Peinado, D. Kassen, T. Hussenet, D. Metzger, P. Chambon, M. Huber, D. Hohl, A. Cano, W. Birchmeier and J. Huelsken (2008). "Cutaneous cancer stem cell maintenance is dependent on beta-catenin signalling." Nature **452**(7187): 650-653.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2001). "To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer." Nat Rev Cancer **1**(3): 222-231.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica and F. Balkwill (2008). "Cancer-related inflammation." Nature **454**(7203): 436-444.
- Marques-Torres, M. A., E. Porlan, A. Banito, E. Gomez-Ibarlucea, A. J. Lopez-Contreras, O. Fernandez-Capetillo, A. Vidal, J. Gil, J. Torres and I. Farinas (2013). "Cyclin-dependent kinase inhibitor p21 controls adult neural stem cell expansion by regulating Sox2 gene expression." Cell Stem Cell **12**(1): 88-100.
- Martin-Caballero, J., J. M. Flores, P. Garcia-Palencia, M. Collado and M. Serrano (2004). "Different cooperating effect of p21 or p27 deficiency in combination with INK4a/ARF deletion in mice." Oncogene **23**(50): 8231-8237.
- Martin-Caballero, J., J. M. Flores, P. Garcia-Palencia and M. Serrano (2001). "Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice." Cancer Res **61**(16): 6234-6238.
- Martinez-Cruz, A. B., C. Costa, C. Saiz, J. M. Paramio and M. Santos (2010). "In vivo transplantation of genetically modified mouse embryonic epidermis." Methods Mol Biol **585**: 361-367.

- Martinez-Cruz, A. B., M. Santos, R. Garcia-Escudero, M. Moral, C. Segrelles, C. Lorz, C. Saiz, A. Buitrago-Perez, C. Costa and J. M. Paramio (2009). "Spontaneous tumor formation in Trp53-deficient epidermis mediated by chromosomal instability and inflammation." Anticancer Res **29**(8): 3035-3042.
- Martinez-Cruz, A. B., M. Santos, M. F. Lara, C. Segrelles, S. Ruiz, M. Moral, C. Lorz, R. Garcia-Escudero and J. M. Paramio (2008). "Spontaneous squamous cell carcinoma induced by the somatic inactivation of retinoblastoma and Trp53 tumor suppressors." Cancer Res **68**(3): 683-692.
- Mayol, X., X. Grana, A. Baldi, N. Sang, Q. Hu and A. Giordano (1993). "Cloning of a new member of the retinoblastoma gene family (pRb2) which binds to the E1A transforming domain." Oncogene **8**(9): 2561-2566.
- McCampbell, A. S., R. R. Broaddus and C. L. Walker (2010). "Loss of inhibitory insulin receptor substrate-1 phosphorylation: An early event in endometrial hyperplasia and progression to carcinoma." Cell Cycle **9**(14): 2698-2699.
- McMurray, H. R., E. R. Sampson, G. Compitello, C. Kinsey, L. Newman, B. Smith, S. R. Chen, L. Klebanov, P. Salzman, A. Yakovlev and H. Land (2008). "Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype." Nature **453**(7198): 1112-1116.
- Mehrel, T., D. Hohl, J. A. Rothnagel, M. A. Longley, D. Bundman, C. Cheng, U. Lichti, M. E. Bisher, A. C. Steven, P. M. Steinert and et al. (1990). "Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin." Cell **61**(6): 1103-1112.
- Meuwissen, R., J. Jonkers and A. Berns (2001). "Mouse models for sporadic cancer." Exp Cell Res **264**(1): 100-110.
- Milner, L. A. and A. Bigas (1999). "Notch as a mediator of cell fate determination in hematopoiesis: evidence and speculation." Blood **93**(8): 2431-2448.
- Mills, A. A., B. Zheng, X. J. Wang, H. Vogel, D. R. Roop and A. Bradley (1999). "p63 is a p53 homologue required for limb and epidermal morphogenesis." Nature **398**(6729): 708-713.
- Missero, C., F. Di Cunto, H. Kiyokawa, A. Koff and G. P. Dotto (1996). "The absence of p21Cip1/WAF1 alters keratinocyte growth and differentiation and promotes ras-tumor progression." Genes Dev **10**(23): 3065-3075.
- Molinolo, A. A., S. M. Hewitt, P. Amornphimoltham, S. Keelawat, S. Rangdaeng, A. Meneses Garcia, A. R. Raimondi, R. Jufe, M. Itoiz, Y. Gao, D. Saranath, G. S. Kaleebi, G. H. Yoo, L. Leak, E. M. Myers, S. Shintani, D. Wong, H. D. Massey, W. A. Yeudall, F. Lonardo, J. Ensley and J. S. Gutkind (2007). "Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative." Clin Cancer Res **13**(17): 4964-4973.
- Moll, R., W. W. Franke, D. L. Schiller, B. Geiger and R. Krepler (1982). "The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells." Cell **31**(1): 11-24.
- Moral, M. and J. M. Paramio (2008). "Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC." Histol Histopathol **23**(10): 1269-1278.

- Moral, M., C. Segrelles, M. F. Lara, A. B. Martinez-Cruz, C. Lorz, M. Santos, R. Garcia-Escudero, J. Lu, K. Kiguchi, A. Buitrago, C. Costa, C. Saiz, J. L. Rodriguez-Peralto, F. J. Martinez-Tello, M. Rodriguez-Pinilla, M. Sanchez-Cespedes, M. Garin, T. Grande, A. Bravo, J. DiGiovanni and J. M. Paramio (2009). "Akt activation synergizes with Trp53 loss in oral epithelium to produce a novel mouse model for head and neck squamous cell carcinoma." *Cancer Res* **69**(3): 1099-1108.
- Movahedi, K., D. Laoui, C. Gysemans, M. Baeten, G. Stange, J. Van den Bossche, M. Mack, D. Pipeleers, P. In't Veld, P. De Baetselier and J. A. Van Ginderachter (2010). "Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes." *Cancer Res* **70**(14): 5728-5739.
- Mundy-Bosse, B. L., G. B. Lesinski, A. C. Jaime-Ramirez, K. Benninger, M. Khan, P. Kuppusamy, K. Guenterberg, S. V. Kondadasula, A. R. Chaudhury, K. M. La Perle, M. Kreiner, G. Young, D. C. Guttridge and W. E. Carson, 3rd (2011). "Myeloid-derived suppressor cell inhibition of the IFN response in tumor-bearing mice." *Cancer Res* **71**(15): 5101-5110.
- Munger, K., B. A. Werness, N. Dyson, W. C. Phelps, E. Harlow and P. M. Howley (1989). "Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product." *EMBO J* **8**(13): 4099-4105.
- Murugan, A. K., A. K. Munirajan and N. Tsuchida (2012). "Ras oncogenes in oral cancer: the past 20 years." *Oral Oncol* **48**(5): 383-392.
- Nakagawa, H., T. C. Wang, L. Zukerberg, R. Odze, K. Togawa, G. H. May, J. Wilson and A. K. Rustgi (1997). "The targeting of the cyclin D1 oncogene by an Epstein-Barr virus promoter in transgenic mice causes dysplasia in the tongue, esophagus and forestomach." *Oncogene* **14**(10): 1185-1190.
- Nathan, C. (2002). "Points of control in inflammation." *Nature* **420**(6917): 846-852.
- Nestle, F. O., P. Di Meglio, J. Z. Qin and B. J. Nickoloff (2009). "Skin immune sentinels in health and disease." *Nat Rev Immunol* **9**(10): 679-691.
- Neville, B. W. and T. A. Day (2002). "Oral cancer and precancerous lesions." *CA Cancer J Clin* **52**(4): 195-215.
- Nicolas, M., A. Wolfer, K. Raj, J. A. Kummer, P. Mill, M. van Noort, C. C. Hui, H. Clevers, G. P. Dotto and F. Radtke (2003). "Notch1 functions as a tumor suppressor in mouse skin." *Nat Genet* **33**(3): 416-421.
- O'Donnell, R. K., M. Kupferman, S. J. Wei, S. Singhal, R. Weber, B. O'Malley, Y. Cheng, M. Putt, M. Feldman, B. Ziober and R. J. Muschel (2005). "Gene expression signature predicts lymphatic metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity." *Oncogene* **24**(7): 1244-1251.
- Opitz, O. G., H. Harada, Y. Suliman, B. Rhoades, N. E. Sharpless, R. Kent, L. Kopelovich, H. Nakagawa and A. K. Rustgi (2002). "A mouse model of human oral-esophageal cancer." *J Clin Invest* **110**(6): 761-769.
- Oro, A. E., K. M. Higgins, Z. Hu, J. M. Bonifas, E. H. Epstein, Jr. and M. P. Scott (1997). "Basal cell carcinomas in mice overexpressing sonic hedgehog." *Science* **276**(5313): 817-821.

- Owen, J. D., R. Strieter, M. Burdick, H. Haghnegahdar, L. Nanney, R. Shattuck-Brandt and A. Richmond (1997). "Enhanced tumor-forming capacity for immortalized melanocytes expressing melanoma growth stimulatory activity/growth-regulated cytokine beta and gamma proteins." Int J Cancer **73**(1): 94-103.
- Ozanne, B., C. S. Richards, F. Hendler, D. Burns and B. Gusterson (1986). "Over-expression of the EGF receptor is a hallmark of squamous cell carcinomas." J Pathol **149**(1): 9-14.
- Page, A., J. L. Cascallana, M. L. Casanova, M. Navarro, J. P. Alameda, P. Perez, A. Bravo and A. Ramirez (2011). "IKKbeta overexpression leads to pathologic lesions in stratified epithelia and exocrine glands and to tumoral transformation of oral epithelia." Mol Cancer Res **9**(10): 1329-1338.
- Page, A., M. Navarro, M. Garin, P. Perez, M. L. Casanova, R. Moreno, J. L. Jorcano, J. L. Cascallana, A. Bravo and A. Ramirez (2010). "IKKbeta leads to an inflammatory skin disease resembling interface dermatitis." J Invest Dermatol **130**(6): 1598-1610.
- Paramio, J. M., C. Segrelles, S. Ruiz, J. Martin-Caballero, A. Page, J. Martinez, M. Serrano and J. L. Jorcano (2001). "The ink4a/arf tumor suppressors cooperate with p21cip1/waf in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence, and carcinogenesis." J Biol Chem **276**(47): 44203-44211.
- Parker, S. B., G. Eichele, P. Zhang, A. Rawls, A. T. Sands, A. Bradley, E. N. Olson, J. W. Harper and S. J. Elledge (1995). "p53-independent expression of p21Cip1 in muscle and other terminally differentiating cells." Science **267**(5200): 1024-1027.
- Parsa, R., A. Yang, F. McKeon and H. Green (1999). "Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes." J Invest Dermatol **113**(6): 1099-1105.
- Pastore, S., F. Mascia, F. Mariotti, C. Dattilo and G. Girolomoni (2004). "Chemokine networks in inflammatory skin diseases." Eur J Dermatol **14**(4): 203-208.
- Patel, V., C. A. Marsh, R. T. Dorsam, C. M. Mikelis, A. Masedunskas, P. Amornphimoltham, C. A. Nathan, B. Singh, R. Weigert, A. A. Molinolo and J. S. Gutkind (2011). "Decreased lymphangiogenesis and lymph node metastasis by mTOR inhibition in head and neck cancer." Cancer Res **71**(22): 7103-7112.
- Pedrero, J. M., D. G. Carracedo, C. M. Pinto, A. H. Zapatero, J. P. Rodrigo, C. S. Nieto and M. V. Gonzalez (2005). "Frequent genetic and biochemical alterations of the PI 3-K/AKT/PTEN pathway in head and neck squamous cell carcinoma." Int J Cancer **114**(2): 242-248.
- Pelengaris, S., T. Littlewood, M. Khan, G. Elia and G. Evan (1999). "Reversible activation of c-Myc in skin: induction of a complex neoplastic phenotype by a single oncogenic lesion." Mol Cell **3**(5): 565-577.
- Perez-Ordóñez, B., M. Beauchemin and R. C. Jordan (2006). "Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck." J Clin Pathol **59**(5): 445-453.
- Perez-Sayans, M., J. M. Suarez-Penaranda, P. Gayoso-Diz, F. Barros-Angueira, J. M. Gandara-Rey and A. Garcia-Garcia (2013). "The role of p21Waf1/CIP1 as a Cip/Kip type cell-cycle regulator in oral squamous cell carcinoma (Review)." Med Oral Patol Oral Cir Bucal **18**(2): e219-225.

- Perucca, P., O. Cazzalini, M. Madine, M. Savio, R. A. Laskey, V. Vannini, E. Prosperi and L. A. Stivala (2009). "Loss of p21 CDKN1A impairs entry to quiescence and activates a DNA damage response in normal fibroblasts induced to quiescence." *Cell Cycle* **8**(1): 105-114.
- Philipp, J., K. Vo, K. E. Gurley, K. Seidel and C. J. Kemp (1999). "Tumor suppression by p27Kip1 and p21Cip1 during chemically induced skin carcinogenesis." *Oncogene* **18**(33): 4689-4698.
- Pickering, C. R., J. Zhang, S. Y. Yoo, L. Bengtsson, S. Moorthy, D. M. Neskey, M. Zhao, M. V. Ortega Alves, K. Chang, J. Drummond, E. Cortez, T. X. Xie, D. Zhang, W. Chung, J. P. Issa, P. A. Zweidler-McKay, X. Wu, A. K. El-Naggar, J. N. Weinstein, J. Wang, D. M. Muzny, R. A. Gibbs, D. A. Wheeler, J. N. Myers and M. J. Frederick (2013). "Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers." *Cancer Discov* **3**(7): 770-781.
- Plewig, G., T. Jansen and N. Y. Schurer (1997). "[Stratum corneum]." *Hautarzt* **48**(7): 510-521; quiz 520.
- Polivka, J., Jr. and F. Janku (2014). "Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway." *Pharmacol Ther* **142**(2): 164-175.
- Poole, A. J., D. Heap, R. E. Carroll and A. L. Tyner (2004). "Tumor suppressor functions for the Cdk inhibitor p21 in the mouse colon." *Oncogene* **23**(49): 8128-8134.
- Potten, C. S. and R. J. Morris (1988). "Epithelial stem cells in vivo." *J Cell Sci Suppl* **10**: 45-62.
- Potten, C. S., R. Saffhill and H. I. Maibach (1987). "Measurement of the transit time for cells through the epidermis and stratum corneum of the mouse and guinea-pig." *Cell Tissue Kinet* **20**(5): 461-472.
- Potts, R. O. and M. L. Francoeur (1991). "The influence of stratum corneum morphology on water permeability." *J Invest Dermatol* **96**(4): 495-499.
- Powers, J. T., S. Hong, C. N. Mayhew, P. M. Rogers, E. S. Knudsen and D. G. Johnson (2004). "E2F1 uses the ATM signaling pathway to induce p53 and Chk2 phosphorylation and apoptosis." *Mol Cancer Res* **2**(4): 203-214.
- Priya, C. G., P. Arpitha, S. Vaishali, N. V. Prajna, K. Usha, K. Sheetal and V. Muthukkaruppan (2011). "Adult human buccal epithelial stem cells: identification, ex-vivo expansion, and transplantation for corneal surface reconstruction." *Eye (Lond)* **25**(12): 1641-1649.
- Pyeon, D., M. A. Newton, P. F. Lambert, J. A. den Boon, S. Sengupta, C. J. Marsit, C. D. Woodworth, J. P. Connor, T. H. Haugen, E. M. Smith, K. T. Kelsey, L. P. Turek and P. Ahlquist (2007). "Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers." *Cancer Res* **67**(10): 4605-4619.
- Quadros, M. R., F. Peruzzi, C. Kari and U. Rodeck (2004). "Complex regulation of signal transducers and activators of transcription 3 activation in normal and malignant keratinocytes." *Cancer Res* **64**(11): 3934-3939.
- Quintin, J., S. C. Cheng, J. W. van der Meer and M. G. Netea (2014). "Innate immune memory: towards a better understanding of host defense mechanisms." *Curr Opin Immunol* **29C**: 1-7.

- Reich, N. C. (2013). "STATs get their move on." JAKSTAT **2**(4): e27080.
- Reya, T. and H. Clevers (2005). "Wnt signalling in stem cells and cancer." Nature **434**(7035): 843-850.
- Rhodes, D. R., S. Kalyana-Sundaram, V. Mahavisno, R. Varambally, J. Yu, B. B. Briggs, T. R. Barrette, M. J. Anstet, C. Kincaid-Beal, P. Kulkarni, S. Varambally, D. Ghosh and A. M. Chinnaiyan (2007). "Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles." Neoplasia **9**(2): 166-180.
- Rhodes, D. R., J. Yu, K. Shanker, N. Deshpande, R. Varambally, D. Ghosh, T. Barrette, A. Pandey and A. M. Chinnaiyan (2004). "ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform." Neoplasia **6**(1): 1-6.
- Rickman, D. S., R. Millon, A. De Reynies, E. Thomas, C. Wasylyk, D. Muller, J. Abecassis and B. Wasylyk (2008). "Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays." Oncogene **27**(51): 6607-6622.
- Richmond, A. and H. G. Thomas (1988). "Melanoma growth stimulatory activity: isolation from human melanoma tumors and characterization of tissue distribution." J Cell Biochem **36**(2): 185-198.
- Roberts, S. J., B. Y. Ng, R. B. Filler, J. Lewis, E. J. Glusac, A. C. Hayday, R. E. Tigelaar and M. Girardi (2007). "Characterizing tumor-promoting T cells in chemically induced cutaneous carcinogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(16): 6770-6775.
- Rodriguez-Puebla, M. L., M. LaCava, P. L. Miliani De Marval, J. L. Jorcano, E. R. Richie and C. J. Conti (2000). "Cyclin D2 overexpression in transgenic mice induces thymic and epidermal hyperplasia whereas cyclin D3 expression results only in epidermal hyperplasia." Am J Pathol **157**(3): 1039-1050.
- Roninson, I. B. (2002). "Oncogenic functions of tumour suppressor p21(Waf1/Cip1/Sdi1): association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts." Cancer Lett **179**(1): 1-14.
- Rowland, B. D. and D. S. Peeper (2006). "KLF4, p21 and context-dependent opposing forces in cancer." Nat Rev Cancer **6**(1): 11-23.
- Rubin, L. L. and F. J. de Sauvage (2006). "Targeting the Hedgehog pathway in cancer." Nat Rev Drug Discov **5**(12): 1026-1033.
- Ruiz, S., M. Santos, M. F. Lara, C. Segrelles, C. Ballestin and J. M. Paramio (2005). "Unexpected roles for pRb in mouse skin carcinogenesis." Cancer Res **65**(21): 9678-9686.
- Ruiz, S., M. Santos and J. M. Paramio (2006). "Is the loss of pRb essential for the mouse skin carcinogenesis?" Cell Cycle **5**(6): 625-629.
- Ruiz, S., M. Santos, C. Segrelles, H. Leis, J. L. Jorcano, A. Berns, J. M. Paramio and M. Vooijs (2004). "Unique and overlapping functions of pRb and p107 in the control of proliferation and differentiation in epidermis." Development **131**(11): 2737-2748.

- Ruiz, S., C. Segrelles, A. Bravo, M. Santos, P. Perez, H. Leis, J. L. Jorcano and J. M. Paramio (2003). "Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130." Development **130**(11): 2341-2353.
- Ryter, S. W., K. Mizumura and A. M. Choi (2014). "The Impact of Autophagy on Cell Death Modalities." Int J Cell Biol **2014**: 502676.
- Saeed, A. I., V. Sharov, J. White, J. Li, W. Liang, N. Bhagabati, J. Braisted, M. Klapa, T. Currier, M. Thiagarajan, A. Sturn, M. Snuffin, A. Rezantsev, D. Popov, A. Ryltsov, E. Kostukovich, I. Borisovsky, Z. Liu, A. Vinsavich, V. Trush and J. Quackenbush (2003). "TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis." Biotechniques **34**(2): 374-378.
- Saha, P., Q. Eichbaum, E. D. Silberman, B. J. Mayer and A. Dutta (1997). "p21CIP1 and Cdc25A: competition between an inhibitor and an activator of cyclin-dependent kinases." Mol Cell Biol **17**(8): 4338-4345.
- Saini, K. S., S. Loi, E. de Azambuja, O. Metzger-Filho, M. L. Saini, M. Ignatiadis, J. E. Dancey and M. J. Piccart-Gebhart (2013). "Targeting the PI3K/AKT/mTOR and Raf/MEK/ERK pathways in the treatment of breast cancer." Cancer Treat Rev **39**(8): 935-946.
- Santarosa, M. and A. Ashworth (2004). "Haploinsufficiency for tumour suppressor genes: when you don't need to go all the way." Biochim Biophys Acta **1654**(2): 105-122.
- Santos, M., J. M. Paramio, A. Bravo, A. Ramirez and J. L. Jorcano (2002). "The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis." J Biol Chem **277**(21): 19122-19130.
- Sauer, B. and N. Henderson (1988). "Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(14): 5166-5170.
- Sawaf, M. H., A. H. Shabana, A. Pelissier, N. Forest and J. P. Ouhayoun (1991). "Characterization of cytokeratin patterns in the developing human tongue." Int J Dev Biol **35**(2): 91-100.
- Schafer, M. and S. Werner (2008). "Cancer as an overhealing wound: an old hypothesis revisited." Nat Rev Mol Cell Biol **9**(8): 628-638.
- Schlingemann, J., N. Habtemichael, C. Ittrich, G. Toedt, H. Kramer, M. Hambek, R. Knecht, P. Lichter, R. Stauber and M. Hahn (2005). "Patient-based cross-platform comparison of oligonucleotide microarray expression profiles." Lab Invest **85**(8): 1024-1039.
- Schroeder, A., O. Mueller, S. Stocker, R. Salowsky, M. Leiber, M. Gassmann, S. Lightfoot, W. Menzel, M. Granzow and T. Ragg (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." BMC Mol Biol **7**: 3.
- Segrelles, C., J. Lu, B. Hammann, M. Santos, M. Moral, J. L. Cascallana, M. F. Lara, O. Rho, S. Carbajal, J. Traag, L. Beltran, A. B. Martinez-Cruz, R. Garcia-Escudero, C. Lorz, S. Ruiz, A. Bravo, J. M. Paramio and J. DiGiovanni (2007). "Deregulated Activity of Akt in Epithelial Basal Cells Induces Spontaneous Tumors and Heightened Sensitivity to Skin Carcinogenesis." Cancer Res **67**(22): 10879-10888.

- Segrelles, C., M. Moral, M. F. Lara, S. Ruiz, M. Santos, H. Leis, R. Garcia-Escudero, A. B. Martinez-Cruz, J. Martinez-Palacio, P. Hernandez, C. Ballestin and J. M. Paramio (2006). "Molecular determinants of Akt-induced keratinocyte transformation." *Oncogene* **25**(8): 1174-1185.
- Segrelles, C., S. Ruiz, P. Perez, C. Murga, M. Santos, I. V. Budunova, J. Martinez, F. Larcher, T. J. Slaga, J. S. Gutkind, J. L. Jorcano and J. M. Paramio (2002). "Functional roles of Akt signaling in mouse skin tumorigenesis." *Oncogene* **21**(1): 53-64.
- Sengupta, S., J. A. den Boon, I. H. Chen, M. A. Newton, D. B. Dahl, M. Chen, Y. J. Cheng, W. H. Westra, C. J. Chen, A. Hildesheim, B. Sugden and P. Ahlquist (2006). "Genome-wide expression profiling reveals EBV-associated inhibition of MHC class I expression in nasopharyngeal carcinoma." *Cancer Res* **66**(16): 7999-8006.
- Serefoglou, Z., C. Yapijakis, E. Nkenke and E. Vairaktaris (2008). "Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer." *Oral Oncol* **44**(12): 1093-1099.
- Shen, K. C., H. Heng, Y. Wang, S. Lu, G. Liu, C. X. Deng, S. C. Brooks and Y. A. Wang (2005). "ATM and p21 cooperate to suppress aneuploidy and subsequent tumor development." *Cancer Res* **65**(19): 8747-8753.
- Sherr, C. J. and F. McCormick (2002). "The RB and p53 pathways in cancer." *Cancer Cell* **2**(2): 103-112.
- Sherr, C. J. and J. M. Roberts (1999). "CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression." *Genes Dev* **13**(12): 1501-1512.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." *Mol Cell* **9**(3): 459-470.
- Shiloh, Y. (2003). "ATM and related protein kinases: safeguarding genome integrity." *Nat Rev Cancer* **3**(3): 155-168.
- Shiloh, Y. and M. B. Kastan (2001). "ATM: genome stability, neuronal development, and cancer cross paths." *Adv Cancer Res* **83**: 209-254.
- Shin, M. K., S. Balsitis, T. Brake and P. F. Lambert (2009). "Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21Cip1 in cervical carcinogenesis." *Cancer Res* **69**(14): 5656-5663.
- Siavash, H., N. G. Nikitakis and J. J. Sauk (2004). "Signal transducers and activators of transcription: insights into the molecular basis of oral cancer." *Crit Rev Oral Biol Med* **15**(5): 298-307.
- Silva, T. A., F. L. Ribeiro, H. H. Oliveira-Neto, S. Watanabe, C. Alencar Rde, S. Y. Fukada, F. Q. Cunha, C. R. Leles, E. F. Mendonca and A. C. Batista (2007). "Dual role of CCL3/CCR1 in oral squamous cell carcinoma: implications in tumor metastasis and local host defense." *Oncol Rep* **18**(5): 1107-1113.
- Sinha, S. and E. Fuchs (2001). "Identification and dissection of an enhancer controlling epithelial gene expression in skin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(5): 2455-2460.

- Skinner, H. D., V. C. Sandulache, T. J. Ow, R. E. Meyn, J. S. Yordy, B. M. Beadle, A. L. Fitzgerald, U. Giri, K. K. Ang and J. N. Myers (2012). "TP53 disruptive mutations lead to head and neck cancer treatment failure through inhibition of radiation-induced senescence." Clin Cancer Res **18**(1): 290-300.
- Slebos, R. J., Y. Yi, K. Ely, J. Carter, A. Evjen, X. Zhang, Y. Shyr, B. M. Murphy, A. J. Cmelak, B. B. Burkey, J. L. Netterville, S. Levy, W. G. Yarbrough and C. H. Chung (2006). "Gene expression differences associated with human papillomavirus status in head and neck squamous cell carcinoma." Clin Cancer Res **12**(3 Pt 1): 701-709.
- Slomovitz, B. M. and R. L. Coleman (2012). "The PI3K/AKT/mTOR pathway as a therapeutic target in endometrial cancer." Clin Cancer Res **18**(21): 5856-5864.
- Smeets, S. J., M. van der Plas, T. B. Schaaij-Visser, E. A. van Veen, J. van Meerloo, B. J. Braakhuis, R. D. Steenbergen and R. H. Brakenhoff (2011). "Immortalization of oral keratinocytes by functional inactivation of the p53 and pRb pathways." Int J Cancer **128**(7): 1596-1605.
- Solanas, G. and S. A. Benitah (2013). "Regenerating the skin: a task for the heterogeneous stem cell pool and surrounding niche." Nat Rev Mol Cell Biol **14**(11): 737-748.
- Sorensen, C. S., R. G. Syljuasen, J. Falck, T. Schroeder, L. Ronnstrand, K. K. Khanna, B. B. Zhou, J. Bartek and J. Lukas (2003). "Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A." Cancer Cell **3**(3): 247-258.
- Sotillo, R., P. Dubus, J. Martin, E. de la Cueva, S. Ortega, M. Malumbres and M. Barbacid (2001). "Wide spectrum of tumors in knock-in mice carrying a Cdk4 protein insensitive to INK4 inhibitors." EMBO J **20**(23): 6637-6647.
- Sparano, J. A., S. Moulder, A. Kazi, D. Coppola, A. Negassa, L. Vahdat, T. Li, C. Pellegrino, S. Fineberg, P. Munster, M. Malafa, D. Lee, S. Hoschander, U. Hopkins, D. Herschman, J. J. Wright, C. Kleer, S. Merajver and S. M. Sebti (2009). "Phase II trial of tipifarnib plus neoadjuvant doxorubicin-cyclophosphamide in patients with clinical stage IIB-IIIC breast cancer." Clin Cancer Res **15**(8): 2942-2948.
- Specenier, P. and J. B. Vermorken (2013). "Cetuximab: its unique place in head and neck cancer treatment." Biologics **7**: 77-90.
- Sporn, M. B. (1996). "The war on cancer." Lancet **347**(9012): 1377-1381.
- Squarize, C. H., R. M. Castilho, V. Sriuranpong, D. S. Pinto, Jr. and J. S. Gutkind (2006). "Molecular cross-talk between the NFkappaB and STAT3 signaling pathways in head and neck squamous cell carcinoma." Neoplasia **8**(9): 733-746.
- Srivastava, M. K., L. Zhu, M. Harris-White, U. K. Kar, M. Huang, M. F. Johnson, J. M. Lee, D. Elashoff, R. Strieter, S. Dubinett and S. Sharma "Correction: Myeloid Suppressor Cell Depletion Augments Antitumor Activity in Lung Cancer." PLoS One **7**(10).
- Stanley, J. R. and S. H. Yuspa (1983). "Specific epidermal protein markers are modulated during calcium-induced terminal differentiation." J Cell Biol **96**(6): 1809-1814.

- Stark, H. J., D. Breitkreutz, A. Limat, C. M. Ryle, D. Roop, I. Leigh and N. Fusenig (1990). "Keratins 1 and 10 or homologues as regular constituents of inner root sheath and cuticle cells in the human hair follicle." *Eur J Cell Biol* **52**(2): 359-372.
- Steven, A. C., M. E. Bisher, D. R. Roop and P. M. Steinert (1990). "Biosynthetic pathways of filaggrin and loricrin--two major proteins expressed by terminally differentiated epidermal keratinocytes." *J Struct Biol* **104**(1-3): 150-162.
- Stevens, J. B., B. Y. Abdallah, G. Liu, S. D. Horne, S. W. Bremer, K. J. Ye, J. Y. Huang, M. Kurkinen, C. J. Ye and H. H. Heng (2013). "Heterogeneity of cell death." *Cytogenet Genome Res* **139**(3): 164-173.
- Stransky, N., A. M. Egloff, A. D. Tward, A. D. Kostic, K. Cibulskis, A. Sivachenko, G. V. Kryukov, M. S. Lawrence, C. Sougnez, A. McKenna, E. Shefler, A. H. Ramos, P. Stojanov, S. L. Carter, D. Voet, M. L. Cortes, D. Auclair, M. F. Berger, G. Saksena, C. Guiducci, R. C. Onofrio, M. Parkin, M. Romkes, J. L. Weissfeld, R. R. Seethala, L. Wang, C. Rangel-Escareno, J. C. Fernandez-Lopez, A. Hidalgo-Miranda, J. Melendez-Zajgla, W. Winckler, K. Ardlie, S. B. Gabriel, M. Meyerson, E. S. Lander, G. Getz, T. R. Golub, L. A. Garraway and J. R. Grandis (2011). "The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma." *Science* **333**(6046): 1157-1160.
- Su, X., D. Chakravarti, M. S. Cho, L. Liu, Y. J. Gi, Y. L. Lin, M. L. Leung, A. El-Naggar, C. J. Creighton, M. B. Suraokar, I. Wistuba and E. R. Flores (2010). "TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs." *Nature* **467**(7318): 986-990.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(43): 15545-15550.
- Sun, Z. J., L. Zhang, B. Hall, Y. Bian, J. S. Gutkind and A. B. Kulkarni (2012). "Chemopreventive and chemotherapeutic actions of mTOR inhibitor in genetically defined head and neck squamous cell carcinoma mouse model." *Clin Cancer Res* **18**(19): 5304-5313.
- Tabor, M. P., R. H. Brakenhoff, V. M. van Houten, J. A. Kummer, M. H. Snel, P. J. Snijders, G. B. Snow, C. R. Leemans and B. J. Braakhuis (2001). "Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: biological and clinical implications." *Clin Cancer Res* **7**(6): 1523-1532.
- Talbot, S. G., O. c. P, I. S. Sarkaria, R. Ghossein, P. Reddy, I. Ngai, C. N. Cordeiro, R. J. Wong, M. G. Kris, V. W. Rusch and B. Singh (2004). "Squamous cell carcinoma related oncogene regulates angiogenesis through vascular endothelial growth factor-A." *Ann Surg Oncol* **11**(5): 530-534.
- Taylor, G., M. S. Lehrer, P. J. Jensen, T. T. Sun and R. M. Lavker (2000). "Involvement of follicular stem cells in forming not only the follicle but also the epidermis." *Cell* **102**(4): 451-461.
- Thaler, S., P. S. Hahnel, A. Schad, R. Dammann and M. Schuler (2009). "RASSF1A mediates p21Cip1/Waf1-dependent cell cycle arrest and senescence through modulation of the Raf-MEK-ERK pathway and inhibition of Akt." *Cancer Res* **69**(5): 1748-1757.
- Toftgard, R. (2000). "Hedgehog signalling in cancer." *Cell Mol Life Sci* **57**(12): 1720-1731.

- Toledo, L. I., M. Murga, R. Zur, R. Soria, A. Rodriguez, S. Martinez, J. Oyarzabal, J. Pastor, J. R. Bischoff and O. Fernandez-Capetillo "A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations." Nat Struct Mol Biol **18**(6): 721-727.
- Tonon, G., C. Brennan, A. Protopopov, G. Maulik, B. Feng, Y. Zhang, D. B. Khatry, M. J. You, A. J. Aguirre, E. S. Martin, Z. Yang, H. Ji, L. Chin, K. K. Wong and R. A. Depinho (2005). "Common and contrasting genomic profiles among the major human lung cancer subtypes." Cold Spring Harb Symp Quant Biol **70**: 11-24.
- Topley, G. I., R. Okuyama, J. G. Gonzales, C. Conti and G. P. Dotto (1999). "p21(WAF1/Cip1) functions as a suppressor of malignant skin tumor formation and a determinant of keratinocyte stem-cell potential." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(16): 9089-9094.
- Toruner, G. A., C. Ulger, M. Alkan, A. T. Galante, J. Rinaggio, R. Wilk, B. Tian, P. Soteropoulos, M. R. Hameed, M. N. Schwalb and J. J. Dermody (2004). "Association between gene expression profile and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma." Cancer Genet Cytogenet **154**(1): 27-35.
- Trempus, C. S., R. J. Morris, C. D. Bortner, G. Cotsarelis, R. S. Faircloth, J. M. Reece and R. W. Tennant (2003). "Enrichment for living murine keratinocytes from the hair follicle bulge with the cell surface marker CD34." J Invest Dermatol **120**(4): 501-511.
- Trempus, C. S., R. J. Morris, M. Ehinger, A. Elmore, C. D. Bortner, M. Ito, G. Cotsarelis, J. G. Nijhof, J. Peckham, N. Flagler, G. Kissling, M. M. Humble, L. C. King, L. D. Adams, D. Desai, S. Amin and R. W. Tennant (2007). "CD34 expression by hair follicle stem cells is required for skin tumor development in mice." Cancer Res **67**(9): 4173-4181.
- Trimarchi, J. M. and J. A. Lees (2002). "Sibling rivalry in the E2F family." Nat Rev Mol Cell Biol **3**(1): 11-20.
- Tsui, I. F., C. F. Poh, C. Garnis, M. P. Rosin, L. Zhang and W. L. Lam (2009). "Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias." Int J Cancer **125**(9): 2219-2228.
- Uribe, P. and S. Gonzalez (2011). "Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGFR-targeted therapy." Pathol Res Pract **207**(6): 337-342.
- Vakifahmetoglu, H., M. Olsson and B. Zhivotovsky (2008). "Death through a tragedy: mitotic catastrophe." Cell Death Differ **15**(7): 1153-1162.
- van Os, R., G. de Haan and B. J. Dykstra (2009). "Hematopoietic stem cell quiescence: yet another role for p53." Cell Stem Cell **4**(1): 7-8.
- Vandercappellen, J., J. Van Damme and S. Struyf (2008). "The role of CXC chemokines and their receptors in cancer." Cancer Lett **267**(2): 226-244.
- Vaquerizas, J. M., L. Conde, P. Yankilevich, A. Cabezón, P. Minguez, R. Diaz-Uriarte, F. Al-Shahrour, J. Herrero and J. Dopazo (2005). "GEPAS, an experiment-oriented pipeline for the analysis of microarray gene expression data." Nucleic Acids Res **33**(Web Server issue): W616-620.

- Vitale-Cross, L., P. Amornphimoltham, G. Fisher, A. A. Molinolo and J. S. Gutkind (2004). "Conditional expression of K-ras in an epithelial compartment that includes the stem cells is sufficient to promote squamous cell carcinogenesis." Cancer Res **64**(24): 8804-8807.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (2004). "Cancer genes and the pathways they control." Nat Med **10**(8): 789-799.
- Vooijs, M., H. te Riele, M. van der Valk and A. Berns (2002). "Tumor formation in mice with somatic inactivation of the retinoblastoma gene in interphotoreceptor retinol binding protein-expressing cells." Oncogene **21**(30): 4635-4645.
- Waikel, R. L., Y. Kawachi, P. A. Waikel, X. J. Wang and D. R. Roop (2001). "Deregulated expression of c-Myc depletes epidermal stem cells." Nat Genet **28**(2): 165-168.
- Wang, D., J. Russell, H. Xu and D. G. Johnson (2001). "Deregulated expression of DP1 induces epidermal proliferation and enhances skin carcinogenesis." Mol Carcinog **31**(2): 90-100.
- Wang, Y. A., A. Elson and P. Leder (1997). "Loss of p21 increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(26): 14590-14595.
- Weinberg, R. A. (1995). "The retinoblastoma protein and cell cycle control." Cell **81**(3): 323-330.
- Weinberg, W. C., E. Fernandez-Salas, D. L. Morgan, A. Shalizi, E. Mirosh, E. Stanulis, C. Deng, H. Hennings and S. H. Yuspa (1999). "Genetic deletion of p21WAF1 enhances papilloma formation but not malignant conversion in experimental mouse skin carcinogenesis." Cancer Res **59**(9): 2050-2054.
- Weinberg, W. C., N. E. Montano and C. Deng (1997). "Loss of p21CIP1/WAF1 does not recapitulate accelerated malignant conversion caused by p53 loss in experimental skin carcinogenesis." Oncogene **15**(6): 685-690.
- Weissman, I. L., D. J. Anderson and F. Gage (2001). "Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations." Annu Rev Cell Dev Biol **17**: 387-403.
- Whyte, P., K. J. Buchkovich, J. M. Horowitz, S. H. Friend, M. Raybuck, R. A. Weinberg and E. Harlow (1988). "Association between an oncogene and an anti-oncogene: the adenovirus E1A proteins bind to the retinoblastoma gene product." Nature **334**(6178): 124-129.
- Witherden, D. A. and W. L. Havran (2011). "Molecular aspects of epithelial gammadelta T cell regulation." Trends Immunol **32**(6): 265-271.
- Wong, S. Y. and J. F. Reiter (2011). "Wounding mobilizes hair follicle stem cells to form tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(10): 4093-4098.
- Wu, Y., Y. Y. Li, K. Matsushima, T. Baba and N. Mukaida (2008). "CCL3-CCR5 axis regulates intratumoral accumulation of leukocytes and fibroblasts and promotes angiogenesis in murine lung metastasis process." J Immunol **181**(9): 6384-6393.
- Xiong, Y., G. J. Hannon, H. Zhang, D. Casso, R. Kobayashi and D. Beach (1993). "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases." Nature **366**(6456): 701-704.

- Yang, W. C., J. Mathew, A. Velcich, W. Edelmann, R. Kucherlapati, M. Lipkin, K. Yang and L. H. Augenlicht (2001). "Targeted inactivation of the p21(WAF1/cip1) gene enhances Apc-initiated tumor formation and the tumor-promoting activity of a Western-style high-risk diet by altering cell maturation in the intestinal mucosal." Cancer Res **61**(2): 565-569.
- Yao, J. Y. and J. K. Chen (2012). "Roles of p63 in epidermal development and tumorigenesis." Biomed J **35**(6): 457-463.
- Ye, H., T. Yu, S. Temam, B. L. Zober, J. Wang, J. L. Schwartz, L. Mao, D. T. Wong and X. Zhou (2008). "Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma." BMC Genomics **9**: 69.
- Yuspa, S. H., A. E. Kilkenny, P. M. Steinert and D. R. Roop (1989). "Expression of murine epidermal differentiation markers is tightly regulated by restricted extracellular calcium concentrations in vitro." J Cell Biol **109**(3): 1207-1217.
- Zhang, Y., Y. Cheng, X. Ren, T. Hori, K. J. Huber-Keener, L. Zhang, K. L. Yap, D. Liu, L. Shantz, Z. H. Qin, S. Zhang, J. Wang, H. G. Wang, M. Shih le and J. M. Yang (2012). "Dysfunction of nucleus accumbens-1 activates cellular senescence and inhibits tumor cell proliferation and oncogenesis." Cancer Res **72**(16): 4262-4275.
- Zhao, H., J. L. Watkins and H. Piwnica-Worms (2002). "Disruption of the checkpoint kinase 1/cell division cycle 25A pathway abrogates ionizing radiation-induced S and G2 checkpoints." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(23): 14795-14800.

ANEXOS

Anexo 1. Genes con expresión aumentada en la piel del ratón $Rb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$.			
AFFY_ID	Nombre del gen	Símbolo del gen	Expresión
1433489_s_at	fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	2,59
1431772_a_at	intersectin 2	Itsn2	3,86
1432372_a_at	sepiapterin reductase	Spr	3,55
1419745_at	Rho GTPase activating protein 23	Arhgap23	2,98
1426758_s_at	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	Gtl2	2,80
1434167_at	solute carrier family 35, member E4	Slc35e4	3,79
1460199_a_at	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, beta1 subunit	Pafah1b1	3,05
1425613_at	protocadherin alpha 11	Pcdha11	2,70
1439016_x_at	small proline-rich protein 2A	Spr2a	2,88
1452120_at	RIKEN cDNA 4931433E08 gene	4931433E08Rik	3,27
1416853_at	neurochondrin	Ncdn	2,59
1454109_a_at	phosphatidylserine receptor	Ptdsr	2,86
1422434_a_at	RIKEN cDNA 2210010C04 gene	2210010C04Rik	4,56
1450025_at	par-6 partitioning defective 6 homolog gamma (C. elegans)	Pard6g	3,50
1449047_at	RIKEN cDNA 1600020H07 gene	1600020H07Rik	2,56
1422418_s_at	suppressor of Ty 4 homolog 1 (S. cerevisiae) /// suppressor of Ty 4 homolog 2 (S. cerevisiae)	Supt4h1 /// Supt4h2	2,81
1424559_at	expressed sequence AW060207	AW060207	2,99
1450821_at	p300/CBP-associated factor	Pcaf	2,79
1415994_at	cytochrome P450, family 2, subfamily e, polypeptide 1	Cyp2e1	2,80
1449037_at	cAMP responsive element modulator	Crem	2,70
1419712_at	interleukin 3 receptor, alpha chain	Il3ra	3,31
1424432_at	ubiquitin domain containing 1	Ubtd1	3,03
1450522_a_at	H1 histone family, member 0	H1f0	3,34
1437113_s_at	phospholipase D1	Pld1	2,90
1449451_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 11	Serpinb11	2,57
1422945_a_at	kinesin family member 5C	Kif5c	4,13
1422620_s_at	phosphatidic acid phosphatase 2a	Ppap2a	3,63
1455191_x_at	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 beta	Pip5k1b	3,34
1448181_at	Kruppel-like factor 15	Klf15	3,31
1416101_a_at	histone 1, H1c	Hist1h1c	2,57
1451525_at	Rho GTPase activating protein 12	Arhgap12	3,42
1418607_at	zinc finger protein 99	Zfp99	3,24
1460613_x_at	growth hormone	Gh	3,58
1420465_s_at	major urinary protein 1 /// major urinary protein 2	Mup1 /// Mup2	2,51
1421627_at	even skipped homeotic gene 1 homolog	Evx1	2,75
1427463_at	O-acetyltransferase	MGI:2384865	3,23
1424549_at	degenerative spermatocyte homolog 2 (Drosophila), lipid desaturase	Degs2	2,96
1427255_s_at	zinc finger protein 445	Zfp445	2,82
1418483_a_at	glycoprotein galactosyltransferase alpha 1, 3	Ggta1	2,92
1423037_at	angiotensin receptor-like 1	Agtrl1	3,10

1433785_at	myelin-associated oligodendrocytic basic protein	Mobp	4,10
1424882_a_at	RIKEN cDNA 2510015F01 gene	2510015F01Rik	3,11
1422257_s_at	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	Cyp2b10	4,88
1419511_at	mutS homolog 4 (E. coli)	Msh4	2,57
1454605_a_at	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 alpha	Pi4k2a	2,71
1448199_at	ankyrin repeat domain 10	Ankrd10	2,66
1423252_at	hepatoma-derived growth factor, related protein 3	Hdgfrp3	3,96
1421228_at	chemokine (C-C motif) ligand 7	Ccl7	2,90
1460671_at	glutathione peroxidase 1	Gpx1	2,52
1422906_at	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	Abcg2	2,67
1417614_at	creatine kinase, muscle	Ckm	2,80
1455504_a_at	makorin, ring finger protein, 1	Mkrn1	3,41
1447146_s_at	DNA segment, Chr 11, ERATO Doi 730, expressed	D11Ertd730e	4,50
1428016_a_at	Ras interacting protein 1	Rasip1	3,25
1422286_a_at	TG interacting factor	Tgif	3,34
1451251_at	amyloid beta precursor protein (cytoplasmic tail) binding protein 2	Appbp2	3,04
1448154_at	N-myc downstream regulated gene 2	Ndr2	3,14
1416744_at	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	Uap1	4,94
1424452_at	RIKEN cDNA 5730555F13 gene	5730555F13Rik	2,87
1451172_at	RIKEN cDNA 1200015A19 gene	1200015A19Rik	3,37
1448715_x_at	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	Ccrn4l	3,57
1453260_a_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	Ppp2r2a	3,96
1417198_at	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 594, expressed	D8Ertd594e	2,78
1421564_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3C	Serpina3c	2,74
1430117_a_at	zinc finger protein 64	Zfp64	3,67
1420918_at	serum/glucocorticoid regulated kinase 3	Sgk3	2,80
1425678_a_at	SNF related kinase	Snrk	2,95
1453995_a_at	HpaII tiny fragments locus 9c	Htf9c	3,63
1425706_a_at	damage specific DNA binding protein 2	Ddb2	2,87
1421000_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 4	Cnot4	2,43
1424178_at	transmembrane protein 38a	Tmem38a	3,13
1421871_at	SH3-binding domain glutamic acid-rich protein like	Sh3bgrl	3,40
1448382_at	enoyl-Coenzyme A, hydratase/3-hydroxyacyl Coenzyme A dehydrogenase	Ehhadh	3,13
1431304_a_at	RIKEN cDNA 1300007B12 gene	1300007B12Rik	3,53
1448265_x_at	epithelial V-like antigen 1	Eva1	2,77
1417259_a_at	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	Capzb	2,74
1428904_at	RIKEN cDNA E230022H04 gene	E230022H04Rik	3,60
1448291_at	matrix metalloproteinase 9	Mmp9	3,50
1424875_at	spastic paraplegia 20, spartin (Troyer syndrome) homolog (human)	Spg20	3,56
1450303_at	ventral anterior homeobox containing gene 2	Vax2	3,61
1447961_s_at	mitochondrial ribosomal protein L38	Mrpl38	3,73
1423164_at	transmembrane 7 superfamily member 1	Tm7sf1	2,60

1423321_at	myeloid-associated differentiation marker	Myadm	3,09
1436828_a_at	tumor protein D52-like 2	Tpd52l2	3,25
1417234_at	matrix metalloproteinase 11	Mmp11	3,47
1432004_a_at	dynamamin 2	Dnm2	2,97
1431827_a_at	tousled-like kinase 2 (Arabidopsis)	Tlk2	2,67
1416601_a_at	Down syndrome critical region homolog 1 (human)	Dscr1	2,70
1449865_at	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	Sema3a	2,86
1419475_a_at	ets homologous factor	Ehf	2,89
1418768_at	optic atrophy 1 homolog (human)	Opa1	3,34
1427658_at	chitobiase, di-N-acetyl-	Ctbs	2,92
1425475_at	procollagen, type IV, alpha 5	Col4a5	2,76
1421811_at	thrombospondin 1	Thbs1	2,89
1449178_at	PDZ and LIM domain 3	Pdlim3	3,54
1450933_at	phosphodiesterase 7A	Pde7a	3,42
1418451_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2 subunit	Gng2	3,01
1423089_at	tropomodulin 3	Tmod3	3,36
1418667_at	RIKEN cDNA 2410002O22 gene	2410002O22Rik	3,47
1451287_s_at	RIKEN cDNA 2810003C17 gene	2810003C17Rik	3,48
1434856_at	RIKEN cDNA E130014H08 gene	E130014H08Rik	2,54
1425644_at	leptin receptor	Lepr	3,02
1452106_at	nephronectin	Npnt	3,07
1416935_at	transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 2	Trpv2	3,03
1418621_at	RAB2, member RAS oncogene family	Rab2	3,87
1451678_at	RIKEN cDNA 4430402O11 gene	4430402O11Rik	3,27
1417600_at	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	Slc15a2	3,05
1451066_at	leukocyte receptor cluster (LRC) member 4	Leng4	3,56
1426842_at	YTH domain family 3	Ythdf3	3,12
1460633_at	PRP19/PSO4 homolog (S. cerevisiae)	Prp19	2,64
1421239_at	interleukin 6 signal transducer	Il6st	3,61
1418666_at	pentraxin related gene	Ptx3	3,19
1427185_at	MEF2A mRNA, partial 3' UTR sequence	Mef2a	2,93
1419616_at	bone morphogenic protein receptor, type II (serine/threonine kinase)	Bmpr2	4,06
1417013_at	heat shock 27kDa protein 8	Hspb8	3,61
1449774_at	---	---	4,23
1417332_at	regulatory factor X, 2 (influences HLA class II expression)	Rfx2	3,65
1431606_a_at	angel homolog 2 (Drosophila)	Angel2	3,51
1426585_s_at	mitogen activated protein kinase 1	Mapk1	3,06
1460227_at	tissue inhibitor of metalloproteinase 1	Timp1	3,06
1452581_at	RIKEN cDNA 2610304G08 gene	2610304G08Rik	3,90
1460694_s_at	supervillin	Svil	3,12
1419721_at	G protein-coupled receptor 109B	Gpr109b	3,27
1437302_at	adrenergic receptor, beta 2	Adrb2	3,91

1421784_a_at	ephrin A4	Efna4	3,35
1416085_s_at	zinc finger, A20 domain containing 2	Za20d2	3,76
1433595_at	---	---	2,93
1455061_a_at	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 2 (mitochondrial 3-oxoacyl-Coenzyme A thiolase)	Acaa2	3,05
1450129_a_at	suppressor of cytokine signaling 6	Socs6	4,46
1419656_at	solute carrier family 25, member 36	Slc25a36	3,97
1418553_at	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 18	Arhgef18	3,44
1421895_at	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3, structural gene X-linked	Eif2s3x	3,32
1426215_at	dopa decarboxylase	Ddc	2,72
1419223_a_at	dystrobrevin alpha	Dtna	3,04
1428701_at	poliovirus receptor-related 4	Pvrl4	3,13
1427376_a_at	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 5	Map4k5	3,77
1425534_at	staufer (RNA binding protein) homolog 2 (Drosophila)	Stau2	2,99
1422672_at	small proline-rich protein 1B	Spr1b	2,84
1448800_at	reticulon 4 interacting protein 1	Rtn4ip1	2,89
1449247_at	actin related protein M2	MGI:1920603	2,89
1426456_a_at	protein inhibitor of activated STAT 2	Pias2	4,41
1449483_at	polymerase (DNA directed), kappa	Polk	2,79
1448590_at	procollagen, type VI, alpha 1	Col6a1	3,21
1428111_at	solute carrier family 38, member 4	Slc38a4	3,68
AFFX-TrpnX-3_at	---	---	3,15
1455482_at	adaptor protein complex AP-2, alpha 2 subunit	Ap2a2	3,82
1415927_at	actin, alpha, cardiac	Actc1	2,68
1433675_at	RNA, U22 small nucleolar	Rnu22	3,25
1437733_at	Eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2, mRNA	Eif4ebp2	4,55
1425481_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like	Cnot6l	3,25
1452436_at	lysyl oxidase-like 2	Loxl2	3,46
1438640_x_at	phosphoglycerate kinase 1 /// similar to Pkg1 protein	Pkg1	3,29
1421018_at	RIKEN cDNA 1110018J18 gene	1110018J18Rik	2,79
1418889_a_at	casein kinase 1, delta	Csnk1d	3,76
1429783_at	PDZ and LIM domain 5	Pdlim5	3,13
1420990_at	chromodomain helicase DNA binding protein 1	Chd1	3,58
1448724_at	cytokine inducible SH2-containing protein	Cish	3,01
1427492_at	premature ovarian failure 1B	Pof1b	3,42
1451530_at	epidermal growth factor receptor	Egfr	2,64
1452504_s_at	chitinase, di-N-acetyl-	Ctbs	3,40
1450422_a_at	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) containing 1	Kdelc1	2,97
1430020_x_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Hnrpa1 /// LOC225307	3,84
1426208_x_at	pleiomorphic adenoma gene-like 1	Plagl1	3,08
1418946_at	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 1	St3gal1	3,29
1421026_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 12	Gna12	3,03
1424570_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 46	Ddx46	4,64

1428225_s_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	Hnrpdl	3,90
1453239_a_at	ankyrin repeat domain 22	Ankrd22	3,29
1450976_at	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrgr1	3,13
1420394_s_at	glycoprotein 49 A /// leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B, member 4	Gp49a /// Lilrb4	3,91
1421253_at	nebulin-related anchoring protein	Nrap	3,37
1424322_at	apurinic/aprimidinic endonuclease 2	Apex2	2,78
1419536_a_at	v-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A (avian)	Rela	3,33
1451737_at	phosphatidylinositol 3-kinase, regulatory subunit, polypeptide 1 (p85 alpha)	Pik3r1	2,90
1426558_x_at	RIKEN cDNA 3100002L24 gene	3100002L24Rik	2,87
AFFX-GapdhMur	---	---	2,68
1448397_at	gap junction membrane channel protein beta 6	Gjb6	2,84
1434479_at	expressed sequence AI413331	AI413331	2,89
1417517_at	pleiomorphic adenoma gene-like 2	Plagl2	3,71
1450116_at	DNA segment, Chr 3, ERATO Doi 300, expressed	D3ErtD300e	3,48
1424996_at	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	Cflar	2,68
1424808_at	laminin, alpha 4	Lama4	3,72
1450381_a_at	B-cell leukemia/lymphoma 6	Bcl6	4,14
1432264_x_at	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2-like	Cox7a2l	2,68
1415798_at	discoidin domain receptor family, member 1	Ddr1	3,55
1450431_a_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	Nedd4	2,77
1417308_at	pyruvate kinase, muscle	Pkm2	2,76
1417522_at	F-box only protein 32	Fbxo32	2,93
1433674_a_at	RNA, U22 small nucleolar	Rnu22	2,96
1450016_at	cyclin G1	Ccng1	3,34
1435635_at	RIKEN cDNA A030012M09 gene	A030012M09Rik	3,16
1423016_a_at	glycophorin A	Gypa	3,95
1454042_a_at	serine/arginine-rich protein specific kinase 1	Srpkl	3,96
1423238_at	integrin beta 1 binding protein 2	Itgb1bp2	2,79
1436820_at	potassium channel tetramerisation domain containing 11	Kctd11	4,25
1420831_at	quiescin Q6	Qscn6	4,17
1428394_at	phytanoyl-CoA dioxygenase domain containing 1 /// leucine rich repeat containing 8	Phyhd1 /// Lrrc8	3,43
1425330_a_at	protein phosphatase 1B, magnesium dependent, beta isoform	Ppm1b /// LOC433336	4,21
1438674_a_at	splicing factor, arginine/serine-rich 8	Sfrs8	3,23
1421890_at	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	St3gal2	2,93
1417864_at	phosphoglycerate kinase 1 /// similar to Pgk1 protein /// similar to Pgk1 protein	Pgk1 /// LOC432633	2,75
1426642_at	fibronectin 1	Fn1	3,56
1418592_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 4	Dnaja4	2,76
1421939_a_at	stromal antigen 1	Stag1	4,06
1424707_at	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	Tmed10	3,94
1439394_x_at	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	Cdc20	4,87
1431429_a_at	ADP-ribosylation factor-like 4	Arl4	3,50
1451371_at	melanocortin 2 receptor accessory protein	Mrap	2,82

1449984_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	Cxcl2	4,62
1460717_at	testis-specific protein, Y-encoded-like 1	Tspyl1	3,39
1450223_at	apoptotic peptidase activating factor 1	Apaf1	3,72
1451714_a_at	mitogen activated protein kinase kinase 3	Map2k3	2,97
1418728_at	steroidogenic acute regulatory protein	Star	5,01
1419391_at	myogenin	Myog	2,95
1417601_at	regulator of G-protein signaling 1	Rgs1	4,30
1460513_a_at	endothelin receptor type A	Ednra	3,82
1417501_at	F-box only protein 6b	Fbxo6b	4,42
1416467_at	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3, X-linked	Ddx3x	2,71
1451584_at	hepatitis A virus cellular receptor 2	Havcr2	3,03
1418898_at	lin 7 homolog c (C. elegans)	Lin7c	3,76
1425749_at	syntaxin binding protein 6 (amisyn)	Stxbp6	3,97
1450934_at	eukaryotic translation initiation factor 4A2	Eif4a2	2,91
1427831_s_at	zinc finger protein 260	Zfp260	3,00
1416003_at	claudin 11	Cldn11	3,88
1417602_at	period homolog 2 (Drosophila)	Per2	4,45
1416190_a_at	Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae)	Sec61a1	2,69
1423379_at	nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic, calcineurin-dependent 4	Nfatc4	3,58
1426837_at	methionyl aminopeptidase 1	Metap1	3,02
1416856_at	RIKEN cDNA 3230401D17 gene	3230401D17Rik	2,90
1427447_a_at	TRIO and F-actin binding protein	Triobp	4,34
1422974_at	5' nucleotidase, ecto	Nt5e	3,19
1431475_a_at	homeo box A10	Hoxa10	3,76
1460356_at	endothelial cell-specific adhesion molecule	Esam1	3,27
1430533_a_at	catenin (cadherin associated protein), beta 1, 88kDa	Ctnnb1	3,71
1418213_at	keratin complex 1, acidic, gene 23	Krt1-23	3,27
1423071_x_at	hypothetical gene supported by BC019681; BC027236 similar to LOC381508 protein	LOC270335	3,11
1419385_a_at	ubiquilin 1	Ubqln1	3,66
1454984_at	expressed sequence AW061234	AW061234	2,99
1450442_at	adducin 2 (beta)	Add2	3,96
1416892_s_at	RIKEN cDNA 3110001A13 gene	3110001A13Rik	3,62
1425249_a_at	TYRO3 protein tyrosine kinase 3	Tyro3	5,77
1448804_at	cytochrome P450, family 11, subfamily a, polypeptide 1	Cyp11a1	2,94
1424639_a_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase	Hmgcl	3,94
1428662_a_at	homeobox only domain	MGI:1916782	2,88
1425187_at	Sel1 (suppressor of lin-12) 1 homolog (C. elegans)	Sel1h	3,46
1425574_at	Eph receptor A3	Epha3	2,90
1422110_at	hairless	Hr	4,89
1425030_at	zinc finger protein 622	Zfp622	4,17
1425257_at	acyl-CoA thioesterase 5	Acot5	3,62
1422190_at	complement component 5, receptor 1	C5r1	4,33
1418017_at	pumilio 2 (Drosophila)	Pum2	4,05

1416328_a_at	ATPase, H ⁺ transporting, V0 subunit	Atp6v0e	3,21
1434440_at	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 1	Gnai1	3,58
1423954_at	complement component 3	C3	3,13
1448859_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13	3,32
1423072_at	RIKEN cDNA 6720475J19 gene	6720475J19Rik	4,19
1424701_at	protocadherin 20	Pcdh20	3,49
1427318_s_at	dysferlin /// fer-1-like 3, myoferlin (C. elegans)	Dysf /// Fer1l3	3,92
1422728_at	inhibin alpha	Inha	2,79
1425803_a_at	methyl-CpG binding domain protein 2	Mbd2	4,14
1456155_x_at	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	Fuca1	4,00
1449976_a_at	G protein-coupled receptor 35	Gpr35	3,87
1450156_a_at	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	Hmmr	3,62
1429457_at	RIKEN cDNA 2310020A21 gene	2310020A21Rik	3,31
1425472_a_at	lamin A	Lmna	3,66
1432399_a_at	Eph receptor A1	Epha1	3,53
1425331_at	zinc finger protein 106	Zfp106	3,53
1459990_at	Discoidin domain receptor family, member 1 (Ddr1), mRNA	Ddr1	2,90
1417048_at	prominin 2	Prom2	4,11
1450968_at	ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	Uqcrcfs1	3,27
AFFX-GapdhMur	---	---	3,03
1437591_a_at	WD repeat domain 1	Wdr1	3,67
1454699_at	sestrin 1	Sesn1	4,36
1421925_at	mitogen-activated protein kinase 11	Mapk11	4,65
1422540_at	fibulin 1	Fbln1	2,93
1419899_at	Zinc finger CCCH type containing 7 A (Zc3h7a), mRNA	Zc3hdc7	3,93
1426360_at	zinc finger CCCH type containing 11A	Zc3h11a	4,10
1424158_at	---	---	3,92
1419662_at	osteoglycin	Ogn	3,57
1422871_at	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 12	Kcnj12	4,44
1425845_a_at	soc-2 (suppressor of clear) homolog (C. elegans)	Shoc2	3,66
1434370_s_at	Fas-associated factor 1	Faf1	3,23
1453851_a_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 gamma	Gadd45g	3,11
1425652_s_at	RNA binding protein gene with multiple splicing	Rbpms	3,70
1448508_at	Traf3 interacting protein 2	Traf3ip2	3,48
1451311_a_at	adiponectin receptor 1	Adipor1	3,46
1426780_at	DNA segment, Chr 14, ERATO Doi 436, expressed	D14Ertd436e	3,93
1426398_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2W (putative)	Ube2w	3,70
1418767_at	cytochrome P450, family 4, subfamily f, polypeptide 13	Cyp4f13	3,26
1416022_at	fatty acid binding protein 5, epidermal	Fabp5	3,43
1436953_at	Wiskott-Aldrich syndrome protein interacting protein	Waspip	2,92
1448538_a_at	DNA segment, Chr 4, Wayne State University 53, expressed	D4Wsu53e	3,35
1420464_s_at	paired-Ig-like receptor A1 - 4/// paired-Ig-like receptor A6 /// leukocyte immunoglobulin-like receptor	Pira1 -4/// Pira6	5,53

1460295_s_at	interleukin 6 signal transducer	Il6st	3,22
1416114_at	SPARC-like 1 (mast9, hevin)	Sparcl1	3,06
1415856_at	embigin	Emb	2,80
1417620_at	RAS-related C3 botulinum substrate 2	Rac2	2,84
1427565_a_at	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	Abcc5	3,60
1451601_a_at	cDNA sequence BC011467	BC011467	3,38
1425605_a_at	limb region 1	Lmbr1	3,48
1425264_s_at	myelin basic protein	Mbp	3,27
1420847_a_at	fibroblast growth factor receptor 2	Fgfr2	3,78
1433491_at	erythrocyte protein band 4.1-like 2	Epb4.1l2	3,46
1450186_s_at	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus	Gnas	3,41
1452316_at	PHD finger protein 22	Phf22	4,54
1437686_x_at	cut-like 1 (Drosophila)	Cutl1	3,27
1435191_at	corneodesmosin	Cdsn	3,64
1421346_a_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	Slc6a6	3,71
1452078_a_at	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 2	Slc11a2	5,82
1426110_a_at	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid G-protein-coupled receptor, 2	Edg2	3,32
1434496_at	polo-like kinase 3 (Drosophila)	Plk3	3,23
1415988_at	high density lipoprotein (HDL) binding protein	Hdlbp	3,37
1456174_x_at	N-myc downstream regulated gene 1	Ndrgr1	2,92
1420813_at	histone deacetylase 7A	Hdac7a	3,16
1431062_a_at	SEC8-like 1 (S. cerevisiae)	Sec8l1	3,14
1433711_s_at	sestrin 1	Sesn1	3,06
1425459_at	myotubularin related protein 2	Mtmr2	3,29
1418275_a_at	E74-like factor 2	Elf2	3,10
1423332_at	syndecan binding protein	Sdcbp	3,40
1453924_a_at	prostaglandin F receptor	Ptgfr	3,26
1455316_x_at	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	Ccrn4l	3,21
1416743_at	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	Uap1	4,16
1422263_at	bradykinin receptor, beta 2	Bdkrb2	3,50
1416132_at	RIKEN cDNA C920006C10 gene	C920006C10Rik	3,35
1425068_a_at	testis expressed gene 264	Tex264	3,69
1426993_at	xenotropic and polytropic retrovirus receptor 1	Xpr1	4,20
1448032_at	5-azacytidine induced gene 2	Azi2	3,21
1423748_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	Pdk1	2,95
1421217_a_at	lectin, galactose binding, soluble 9	Lgals9	2,77
1431938_a_at	phosphomannomutase 2	Pmm2	3,66
1417832_at	SMC (structural maintenance of chromosomes 1)-like 1 (S. cerevisiae)	Smc1l1	3,60
1448061_at	---	---	3,96
1416654_at	solute carrier family 31, member 2	Slc31a2	3,79
1437730_at	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit B (PR 52), alpha isoform	Ppp2r2a	4,00

1421326_at	colony stimulating factor 2 receptor, beta 1, low-affinity (granulocyte-macrophage)	Csf2rb1	3,08
1418283_at	claudin 4	Cldn4	3,13
1418513_at	serine/threonine kinase 3 (Ste20, yeast homolog)	Stk3	3,79
1450017_at	cyclin G1	Ccng1	3,26
1448603_at	serine/arginine-rich protein specific kinase 2	Srpk2	3,53
1422639_at	calcitonin-related polypeptide, beta	Calcb	3,40
1451126_at	MAF1 homolog (S. cerevisiae)	Maf1	3,50
1425273_s_at	epithelial membrane protein 2	Emp2	3,38
1417680_at	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5	Kcna5	4,75
1452925_a_at	membrane-associated ring finger (C3HC4) 5		4,17
1448894_at	aldo-keto reductase family 1, member B8	Akr1b8	3,29
1434025_at	Transcribed locus	---	3,68
1418050_at	glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	Gpld1	3,38
1448561_at	neutrophil cytosolic factor 2	Ncf2	4,27
1449092_at	protein phosphatase 1D magnesium-dependent, delta isoform	Ppm1d	4,01
1450725_s_at	carbonic anhydrase 14	Car14	3,25
1449586_at	plakophilin 1	Pkp1	3,98
1418095_at	small muscle protein, X-linked	Smpx	3,69
1427412_s_at	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6	Rapgef6	4,02
1427650_a_at	runt related transcription factor 1	Runx1	5,38
1415801_at	gap junction membrane channel protein alpha 1	Gja1	3,35
1417818_at	WW domain containing transcription regulator 1	Wwtr1	3,12
1426873_s_at	junction plakoglobin	Jup	3,14
1426285_at	laminin, alpha 2	Lama2	4,06
1449975_a_at	parkin	Park2	2,90
1425145_at	interleukin 1 receptor-like 1	Il1rl1	2,91
1422731_at	LIM domains containing 1	Limd1	3,15
1419069_at	RAB guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1	Rabgef1	4,12
1421775_at	Fc receptor, IgE, high affinity I, alpha polypeptide	Fcer1a	5,25
1415907_at	cyclin D3	Ccnd3	3,06
1431734_a_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4	Dnajb4	4,81
1419313_at	cyclin T1	Ccnt1	3,70
1422721_at	tyrosine kinase, non-receptor, 1	Tnk1	3,65
1449360_at	colony stimulating factor 2 receptor, beta 2, low-affinity (granulocyte-macrophage)	Csf2rb2	3,49
1449939_s_at	delta-like 1 homolog (Drosophila)	Dlk1	2,74
1449548_at	ephrin B2	Efnb2	4,44
1422095_a_at	thymidylate kinase family LPS-inducible member	Tyki	4,86
1423895_a_at	CUG triplet repeat, RNA binding protein 2	Cugbp2	3,16
1418924_at	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 7	Rassf7	4,22
1424968_at	RIKEN cDNA 2210023G05 gene	2210023G05Rik	3,54
1448451_at	adenylate kinase 2	Ak2	3,66
1416239_at	argininosuccinate synthetase 1	Ass1	3,42

1425734_a_at	RIKEN cDNA 2700091N06 gene	2700091N06Rik	5,30
1416094_at	a disintegrin and metalloproteinase domain 9 (meltrin gamma)	Adam9	3,14
1450030_at	dynactin 4	Dctn4	3,78
1418846_at	adaptor-related protein complex AP-4, mu 1	Ap4m1	5,45
1435140_at	Ribosomal protein 10 (Rpl10), mRNA	Ide	3,32
1435243_at	PREDICTED: similar to hypothetical protein FLJ31413 [Mus musculus], mRNA sequence	---	4,00
1424307_at	Rho GTPase activating protein 1	Arhgap1	3,31
1419051_at	OVO homolog-like 1 (Drosophila)	Ovol1	2,99
1422179_at	gap junction membrane channel protein beta 4	Gjb4	3,24
1420644_a_at	Sec61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae)	Sec61a2	3,16
1451088_a_at	oxidase assembly 1-like	Oxa1l	3,02
1421198_at	integrin alpha V	Itgav	5,40
1419553_a_at	RAB geranylgeranyl transferase, b subunit	Rabggtb	3,48
1432236_a_at	suppressor of variegation 3-9 homolog 1 (Drosophila)	Suv39h1	3,56
1427571_at	sonic hedgehog	Shh	3,75
1449106_at	glutathione peroxidase 3	Gpx3	3,20
1427074_at	protein-L-isoaspartate (D-aspartate) O-methyltransferase domain containing 2	Pcmt2	3,73
1419184_a_at	four and a half LIM domains 2	Fhl2	3,03
1427024_at	RIKEN cDNA 5033405K12 gene	5033405K12Rik	4,07
1423393_at	chloride intracellular channel 4 (mitochondrial)	Clic4	3,61
1418572_x_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 12a	Tnfrsf12a	4,19
1421184_a_at	RIKEN cDNA 3300001H21 gene /// UbiE-YGHL1 fusion protein /// UbiE-YGHL1 fusion protein	3300001H21Rik	4,40
1421289_at	heat shock protein family, member 7 (cardiovascular)	Hspb7	3,83
1456398_at	expressed sequence AI316828	AI316828	3,29
1436763_a_at	Kruppel-like factor 9	Klf9	4,82
1451355_at	RIKEN cDNA 2410116I05 gene	2410116I05Rik	4,03
1452373_at	RIKEN cDNA 1700081L11 gene	1700081L11Rik	3,07
1450755_at	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha2 subunit	Pafah1b2	2,91
1425096_a_at	pentatricopeptide repeat domain 1	Ptcd1	5,41
1418855_at	RIKEN cDNA 1110008K04 gene	1110008K04Rik	3,26
1450824_at	patched homolog 1	Ptch1	3,47
1460191_at	RIKEN cDNA 0610042I15 gene	0610042I15Rik	3,37
1418735_at	keratin complex 2, basic, gene 4	Krt2-4	4,01
1416102_at	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Ywhaz	3,74
1454971_x_at	TSC22 domain family, member 1	Tsc22d1	3,54
1417356_at	paternally expressed 3	Peg3	2,92
1449944_a_at	Sec61, alpha subunit 2 (S. cerevisiae)	Sec61a2	3,19
1422968_at	inositol hexaphosphate kinase 1	Ihpk1	3,40
1429859_a_at	ADP-ribosylation factor-like 2 binding protein	Arl2bp	4,08
1426624_a_at	yippee-like 3 (Drosophila)	Ypel3	4,07
1455042_at	Transducin (beta)-like 1 X-linked (Tbl1x), mRNA	Tbl1x	4,27
1450008_a_at	catenin (cadherin associated protein), beta 1, 88kDa	Ctnnb1	3,79

1427028_at	leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 6	Lgr6	3,18
1422321_a_at	zinc finger protein 162	Zfp162	4,42
1416296_at	interleukin 2 receptor, gamma chain	Il2rg	3,31
1423017_a_at	interleukin 1 receptor antagonist	Il1rn	3,78
1450618_a_at	small proline-rich protein 2A	Sprr2a	4,16
1448749_at	pleckstrin	Plek	3,63
1452329_at	pleckstrin homology domain containing, family N member 1	Plekhn1	4,45
1425190_a_at	RIKEN cDNA 1700048E23 gene	1700048E23Rik	3,56
1416923_a_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3-like	Bnip3l	4,60
1417184_s_at	hemoglobin beta chain complex /// hemoglobin, beta adult major chain	Hbb /// Hbb-b1 /// Hbb-b2	3,57
1418110_a_at	inositol polyphosphate-5-phosphatase D	Inpp5d	3,53
1431020_a_at	FGFR1 oncogene partner 2	Fgfr1op2	5,81
1424057_at	ganglioside-induced differentiation-associated-protein 2	Gdap2	5,16
1418799_a_at	procollagen, type XVII, alpha 1	Col17a1	4,01
1420971_at	ubiquitin protein ligase E3 component n-recognin 1	Ubr1	4,52
1449109_at	suppressor of cytokine signaling 2	Socs2	3,19
1435847_at	Cdc42 binding protein kinase alpha	Cdc42bpa	4,14
1431592_a_at	SH3-domain kinase binding protein 1	Sh3kbp1	4,48
1426233_at	mitogen activated protein kinase kinase 4	Map2k4	4,29
1420867_at	transmembrane emp24 domain trafficking protein 2	Tmed2	4,01
1424552_at	caspase 8	Casp8	3,70
1434118_at	RIKEN cDNA 0610009K11 gene	0610009K11Rik	3,66
1433496_at	glycosyltransferase 25 domain containing 1	Glt25d1	4,32
1416317_a_at	Stam binding protein	Stambp	3,96
1416403_at	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10	Abcb10	4,26
1425948_a_at	solute carrier family 25, member 30	Slc25a30	3,23
1423870_at	RIKEN cDNA 2610208M17 gene	2610208M17Rik	3,16
1456088_at	Baculoviral IAP repeat-containing 4 (Birc4), mRNA	Birc4	3,84
1426915_at	death associated protein kinase 1	Dapk1	3,26
1460384_a_at	AT rich interactive domain 4B (Rbp1 like)	Arid4b	3,61
1417927_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19a	Ddx19a	2,96
1418860_a_at	LETM1 domain containing 1	Letmd1	3,82
1433483_s_at	expressed sequence C86187	C86187	4,26
1418384_at	RIKEN cDNA 9430083G14 gene	9430083G14Rik	3,29
1416760_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	Galnt1l	3,60
1452175_at	RIKEN cDNA 1810026J23 gene	1810026J23Rik	3,75
1419220_at	cardiomyopathy associated 1	Cmya1	3,86
1418971_x_at	B-cell leukemia/lymphoma 10	Bcl10	4,02
1448194_a_at	H19 fetal liver mRNA	H19	3,71
1416225_at	alcohol dehydrogenase 1 (class I)	Adh1	3,05
1419487_at	myosin binding protein H	Mybph	3,81
AFFX-GapdhMur	---	---	3,21
1426463_at	gephyrin	Gphn	4,37

1419405_at	neuromedin B	Nmb	4,25
1422650_a_at	RIO kinase 3 (yeast)	Riok3	4,37
1437101_at	large tumor suppressor 2	Lats2	4,49
1435587_at	RIKEN cDNA A730042J05 gene	A730042J05Rik	3,83
1452694_at	inositol hexaphosphate kinase 1	lhpk1	4,22
1421860_at	calsyntenin 1	Clstn1	3,75
1420407_at	leukotriene B4 receptor 1	Ltb4r1	2,99
1416419_s_at	gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1	Gabarapl1	3,94
1416209_at	glutamate dehydrogenase 1	Glud1	4,31
1450183_a_at	linker of T-cell receptor pathways	Lnk	3,93
1449391_at	zinc finger protein 37	Zfp37	5,33
1431691_a_at	RAB31, member RAS oncogene family	Rab31	5,32
1448995_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 4	Cxcl4	3,33
1422902_s_at	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	Mgea5	3,24
1421325_at	phospholipase A2, group IIF	Pla2g2f	3,09
1452777_a_at	RIKEN cDNA 6330412F12 gene	6330412F12Rik	4,45
1438446_x_at	putative phosphatase	MGI:1194899	5,02
1418649_at	EGL nine homolog 3 (C. elegans)	Egln3	3,03
1424157_at	EH-domain containing 2	Ehd2	2,99
1419491_at	defensin beta 1	Defb1	3,09
1450089_a_at	signal recognition particle receptor, B subunit	Srprb	4,40
1450957_a_at	sequestosome 1	Sqstm1	4,51
1419467_at	C-type lectin domain family 14, member a	Clec14a	3,52
1448343_a_at	neighbor of Brca1 gene 1	Nbr1	3,26
1423322_at	lin 7 homolog c (C. elegans)	Lin7c	3,53
1422830_s_at	dopamine receptor 4	Drd4	4,72
1421488_at	RAB GTPase activating protein 1-like	Rabgap1l	4,82
1427005_at	polo-like kinase 2 (Drosophila)	Plk2	3,51
1431746_a_at	ubiquitin-activating enzyme E1C	Ube1c	3,74
1460331_at	transmembrane 9 superfamily member 2	Tm9sf2	3,74
1417201_at	5'-nucleotidase, cytosolic II	Nt5c2	3,98
1422803_at	folliculin-like 3	Fstl3	3,25
1416191_at	Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae)	Sec61a1	2,97
1418364_a_at	ferritin light chain 1	Ftl1	3,62
1420350_at	small proline rich-like 2	Sprrl2	3,13
1418131_at	SAM domain and HD domain, 1	Samhd1	4,71
1424053_a_at	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 325, expressed	D8ErtD325e	4,05
1451206_s_at	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	Pscdbp	4,30
1450850_at	villin 2	Vil2	3,43
1422793_at	platelet-activating factor acetylhydrolase, isoform 1b, alpha2 subunit	Pafah1b2	3,14
1451787_at	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 10	Cyp2b10	4,12
1431214_at	RIKEN cDNA 1300007C21 gene /// similar to Retrovirus-related POL polyprotein (Endonuclease)	1300007C21Rik	3,42

1451667_at	RIKEN cDNA C530043G21 gene	C530043G21Rik	3,67
1426816_at	RIKEN cDNA 2210403N09 gene	2210403N09Rik	3,42
1420148_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6	Slc6a6	4,84
1418731_at	ring finger protein 12	Rnf12	4,92
1416418_at	gamma-aminobutyric acid (GABA(A)) receptor-associated protein-like 1	Gabarapl1	4,43
1435030_at	UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog (yeast)	Upf2	4,74
1416740_at	procollagen, type V, alpha 1	Col5a1	3,26
1418963_at	RIKEN cDNA 2310047O13 gene	2310047O13Rik	3,78
1448916_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein G (avian)	Mafg	3,02
1425517_s_at	O-linked N-acetylglucosamine (GlcNAc) transferase	Ogt	4,34
1415921_a_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 19	Tnfrsf19	4,19
1418187_at	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	Ramp2	3,09
1451136_a_at	eukaryotic translation initiation factor 2B, subunit 2 beta	Eif2b2	4,91
1422131_at	decapping enzym	Dcp1a	3,87
1460740_at	clathrin, light polypeptide (Lcb)	Cltb	2,98
1448310_at	intestinal cell kinase	Ick	4,15
1416309_at	nucleolar and spindle associated protein 1	Nusap1	4,09
1426380_at	eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	3,92
1452813_a_at	RIKEN cDNA 5033428A16 gene	5033428A16Rik	3,27
1460341_at	pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 2	Plekhb2	3,88
1423459_at	COP9 (constitutive photomorphogenic) homolog, subunit 2 (Arabidopsis thaliana)	Cops2	4,67
1426083_a_at	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	Btg1	3,81
1453724_a_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade F, member 1	Serpinf1	3,64
1451119_a_at	fibulin 1	Fbln1	3,55
1419943_s_at	cyclin B1	Ccnb1	3,64
1422861_s_at	PDZ and LIM domain 5	Pdlim5	4,05
1415930_a_at	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	Map1lc3b	4,12
1451021_a_at	Kruppel-like factor 5	Klf5	4,57
1455994_x_at	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1	Elov1	3,95
1427163_at	ubiquitin protein ligase E3 component n-recogin 2	Ubr2	4,24
1418603_at	arginine vasopressin receptor 1A	Avpr1a	4,41
1436462_at	PREDICTED: similar to ribosomal protein S8 [Mus musculus], mRNA sequence	C330013J21Rik	4,14
1450392_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	Abca1	5,09
1450533_a_at	pleiomorphic adenoma gene-like 1	Plagl1	3,61
1425026_at	SFT2 domain containing 2	Sft2d2	3,15
1416455_a_at	crystallin, alpha B	Cryab	4,65
1449677_s_at	transmembrane protein 38B	Tmem38b	3,84
1430692_a_at	Sel1 (suppressor of lin-12) 1 homolog (C. elegans)	Sel1h	3,68
1416893_at	RIKEN cDNA 3110001A13 gene	3110001A13Rik	5,34
1422062_at	macrophage scavenger receptor 1	Msr1	4,89
1421857_at	a disintegrin and metallopeptidase domain 17	Adam17	4,34

1454736_at	RIKEN cDNA 4921515A04 gene	4921515A04Rik	4,03
1423746_at	thioredoxin domain containing 5	Txndc5	3,56
1417929_at	solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, γ + system), member 8	Slc7a8	4,34
1423326_at	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 1	Entpd1	4,24
1452347_at	myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	4,36
1417123_at	vav 3 oncogene	Vav3	4,15
1460661_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor, 3	Edg3	3,37
1420425_at	PR domain containing 1, with ZNF domain	Prdm1	4,02
1417033_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2G 2	Ube2g2	4,59
1448617_at	CD53 antigen	Cd53	3,24
1427321_s_at	coxsackievirus and adenovirus receptor	Cxadr	4,52
1423794_at	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 391, expressed	D2Ert391e	4,35
1418279_a_at	A kinase (PRKA) anchor protein 1	Akap1	2,97
1450768_at	discs, large homolog 1 (Drosophila)	Dlgh1	3,20
1427408_a_at	thyroid hormone receptor associated protein 3	Thrap3	3,83
1428895_at	RIKEN cDNA 3222401M22 gene	3222401M22Rik	3,95
1432029_a_at	stromal membrane-associated protein 1	Smap1	4,17
1418460_at	SH3 domain protein D19	Sh3d19	5,22
1451758_at	laminin gamma 3	Lamc3	4,41
1450122_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, G	Ptprg	4,05
1460460_a_at	golgi reassembly stacking protein 2	Gorasp2	4,08
1449082_at	microfibrillar associated protein 5	Mfap5	5,24
1420938_at	heparan sulfate 6-O-sulfotransferase 2	Hs6st2	4,21
1450990_at	glypican 3	Gpc3	3,99
1426147_s_at	claudin 10	Cldn10	4,04
1452954_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2C	Ube2c	5,00
1435446_a_at	choline phosphotransferase 1	Chpt1	4,77
1423076_at	sorting nexin 9	Snx9	5,19
1424304_at	two pore segment channel 2	Tpcn2	3,13
1419508_at	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	Ripk1	4,07
1416940_at	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	Ppif	3,35
1438140_a_at	zinc finger protein 64	Zfp64	4,28
1422153_a_at	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 11	Asb11	4,06
1431630_a_at	Kruppel-like factor 3 (basic)	Klf3	4,02
1419096_at	apolipoprotein M	Apom	5,10
1426245_s_at	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	Mapre2	4,60
1417150_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, serotonin), member 4	Slc6a4	3,09
1422842_at	5'-3' exoribonuclease 2	Xrn2	4,17
1418323_at	feminization 1 homolog b (C. elegans)	Fem1b	3,38
1454015_a_at	cadherin 13	Cdh13	4,49
1450113_at	membrane protein, palmitoylated 5 (MAGUK p55 subfamily member 5)	Mpp5	4,40
1418078_at	proteasome (prosome, macropain) 28 subunit, 3	Psme3	4,09

1423333_at	RIKEN cDNA 1200007D18 gene	1200007D18Rik	4,29
1450817_at	small optic lobes homolog (Drosophila)	Solh	3,24
1416075_at	salvador homolog 1 (Drosophila)	Sav1	4,03
1450134_at	lysyl oxidase-like 4	Loxl4	4,38
1430777_a_at	golgi phosphoprotein 3	Golph3	4,54
1427584_at	angiomotin	Amot	3,61
1423104_at	insulin receptor substrate 1	Irs1	3,40
1425582_a_at	endomucin	MGI:1891716	3,49
1422561_at	a disintegrin-like and metallopeptidase (reprolysin type) with thrombospondin type 1 motif, 5	Adamts5	3,94
1420427_a_at	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 32	Dhx32	4,88
1421041_s_at	glutathione S-transferase, alpha 1 (Ya) /// glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	Gsta1 /// Gsta2	4,21
1421752_a_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 5	Serpinb5	4,21
1452025_a_at	zinc finger protein 2	Zfp2	3,48
1424958_at	carbonic anhydrase 8	Car8	4,66
1427967_at	SLIT-ROBO Rho GTPase activating protein 2	Srgap2	5,62
1449503_at	karyopherin (importin) alpha 1	Kpna1	4,39
1419624_a_at	RIKEN cDNA 1700010I14 gene	1700010I14Rik	4,76
1425561_at	tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1	Trnt1	4,60
1417872_at	four and a half LIM domains 1	Fhl1	4,57
1450103_a_at	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 2	Pscd2	4,92
1428194_at	ubiquitin specific peptidase 9, X chromosome	Usp9x	4,89
1418970_a_at	B-cell leukemia/lymphoma 10	Bcl10	3,02
1450917_at	myomesin 2	Myom2	4,84
1423222_at	CAP, adenylate cyclase-associated protein, 2 (yeast)	Cap2	4,55
1415857_at	embigin	Emb	3,07
1450007_at	RIKEN cDNA 1500003O03 gene	1500003O03Rik	4,60
1421321_a_at	neuroepithelial cell transforming gene 1	Net1	4,48
1425428_at	hypoxia inducible factor 3, alpha subunit	Hif3a	3,50
1423062_at	insulin-like growth factor binding protein 3	Igfbp3	3,37
1420431_at	repetin	Rptn	3,30
1425994_a_at	N-acylsphingosine amidohydrolase 2	Asah2	3,64
1426724_at	calponin 3, acidic	Cnn3	4,56
1425238_at	MRNA similar to ribosomal protein S20 (cDNA clone MGC:6876 IMAGE:2651405)	---	5,35
1419079_at	sodium channel, nonvoltage-gated 1 gamma	Scnn1g	3,98
1436747_at	RIKEN cDNA 1110014K08 gene /// similar to RIKEN cDNA 1110014K08 gene	1110014K08Rik	4,21
1439435_x_at	phosphoglycerate kinase 1 /// similar to Pgk1 protein	Pgk1	4,04
1433593_at	yippee-like 5 (Drosophila)	Ypel5	3,51
1449164_at	CD68 antigen	Cd68	4,33
1448370_at	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)	Ulk1	3,78
1455171_at	suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)	Suv420h1	4,04
1427058_at	eukaryotic translation initiation factor 4A1	Eif4a1	4,62
1447462_at	16 days embryo head cDNA, RIKEN full-length enriched library	---	3,52

1422268_a_at	ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 2	Rps6kb2	4,30
1454875_a_at	retinoblastoma binding protein 4	Rbbp4	3,43
1415751_at	heterochromatin protein 1, binding protein 3	Hp1bp3	4,92
1422749_at	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C	Ly6g6c	4,25
1417819_at	torsin family 1, member B	Tor1b	4,32
1420610_at	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta	Prkacb	4,27
1416086_at	protein-tyrosine sulfotransferase 2	Tpst2	3,93
1452478_at	alpha-kinase 2	Alpk2	5,26
1449456_a_at	mast cell protease 5	Mcpt5	3,21
1450385_at	karyopherin (importin) alpha 3	Kpna3	3,62
1428380_at	RIKEN cDNA 0610007C21 gene	0610007C21Rik	3,57
1427510_at	guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting 1	Gnai1	4,19
1421002_at	angiopoietin-like 2	Angptl2	3,39
1416260_a_at	sorting nexin 1	Snx1	3,97
1420945_at	alpha thalassemia	Atrx	3,67
1437772_s_at	fucosidase, alpha-L- 1, tissue	Fuca1	3,84
1448185_at	homocysteine-inducible	Herpud1	3,70
1420948_s_at	RIKEN cDNA 4833408C14 gene	4833408C14Rik	4,54
1423838_s_at	RIKEN cDNA 2400003C14 gene	2400003C14Rik	4,43
1424612_at	NIPA-like domain containing 2	Npal2	5,16
1416554_at	PDZ and LIM domain 1 (elfin)	Pdlim1	4,18
1420887_a_at	Bcl2-like 1	Bcl2l1	4,10
1449552_at	zinc finger RNA binding protein	Zfr	3,91
1423112_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	Ube2d3	3,26
1426244_at	microtubule-associated protein, RP/EB family, member 2	Mapre2	4,98
1450780_s_at	high mobility group AT-hook 2	Hmga2	4,38
1455575_at	eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 2	Eif4ebp2	5,18
1431554_a_at	annexin A9	Anxa9	4,40
1454635_at	F-box and leucine-rich repeat protein 3	Fbxl3	5,40
1448730_at	carboxypeptidase A3, mast cell	Cpa3	3,33
1426791_at	RUN and SH3 domain containing 2	Rusc2	3,64
1416475_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	Ube2d2	4,62
1416315_at	abhydrolase domain containing 4	Abhd4	4,35
1456412_a_at	putative phosphatase	MGI:1194899	4,58
1417839_at	claudin 5	Cldn5	4,41
1460318_at	cysteine and glycine-rich protein 3	Csrp3	3,69
1448814_at	growth factor receptor bound protein 2-associated protein 1	Gab1	4,55
1425546_a_at	transferrin	Trf	3,43
1448926_at	homeo box A5	Hoxa5	3,42
1418712_at	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5	Cdc42ep5	4,79
1425465_a_at	SUMO/sentrin specific peptidase 2	Senp2	4,76
1418892_at	ras homolog gene family, member J	Rhoj	3,60
1449949_a_at	coxsackievirus and adenovirus receptor	Cxadr	3,88
1426691_at	tight junction associated protein 1	Tjap1	4,72

1451594_s_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6c	Serpinb6c	4,76
1426687_at	mitogen activated protein kinase kinase kinase 3	Map3k3	3,53
1425480_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6-like	Cnot6l	4,26
1416253_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)	Cdkn2d	3,82
1420551_at	RIKEN cDNA 2310039E09 gene	2310039E09Rik	4,32
1452899_at	CDNA for MBII-343 snoRNA	---	3,67
1428816_a_at	GATA binding protein 2	Gata2	3,48
1449363_at	activating transcription factor 3	Atf3	4,19
1420818_at	src-like adaptor	Sla	4,77
1419492_s_at	defensin beta 1	Defb1	4,14
1442026_at	---	---	4,04
1449928_at	t-complex-associated-testis-expressed 1-like	Tcte1l	3,26
1423048_a_at	toll interacting protein	Tollip	5,03
1426328_a_at	sodium channel, voltage-gated, type III, beta	Scn3b	4,54
1419731_at	cytochrome P450, family 2, subfamily b, polypeptide 19	Cyp2b19	4,20
1421313_s_at	cortactin	Ctnn	4,62
1418697_at	indolethylamine N-methyltransferase	Inmt	5,57
1431213_a_at	RIKEN cDNA 1300007C21 gene /// similar to Retrovirus-related POL polyprotein (Endonuclease)	1300007C21Rik	4,88
1418936_at	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene family, protein F (avian)	Maff	4,02
1448159_at	RAB7, member RAS oncogene family	Rab7	3,97
1460498_a_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5	Dnajc5	4,54
1436713_s_at	GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA	Gtl2	3,80
1415734_at	RAB7, member RAS oncogene family	Rab7	4,42
1438910_a_at	stomatin	Stom	4,73
1426824_at	proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4	Psme4	3,89
1416392_a_at	ATPase, H ⁺ transporting, V0 subunit C	Atp6v0c	4,81
1421500_at	steroid sulfatase	Sts	3,71
1428620_at	endosulfine alpha	Ensa	3,57
1427610_at	desmoplakin	Dsp	4,49
1448428_at	neuroblastoma, suppression of tumorigenicity 1	Nbl1	4,93
1424668_a_at	cut-like 1 (Drosophila)	Cutl1	4,66
1417951_at	enolase 3, beta muscle	Eno3	3,27
1450915_at	adaptor-related protein complex 3, beta 1 subunit	Ap3b1	5,30
1450695_at	aryl-hydrocarbon receptor	Ahr	4,68
1422008_a_at	aquaporin 3	Aqp3	3,32
1416652_at	asporin	Aspn	5,64
1417816_s_at	tumor differentially expressed 1	Tde1	4,59
1428532_at	RIKEN cDNA 5930412E23 gene	5930412E23Rik	3,46
1449298_a_at	phosphodiesterase 1A, calmodulin-dependent	Pde1a	4,08
1424988_at	myosin regulatory light chain interacting protein	Mylip	4,17
1435962_at	ribosomal protein S6 /// similar to 40S ribosomal protein S6 /// similar to 40S ribosomal protein S6	Rps6	5,20
1422901_at	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	Mgea5	3,70

1416354_at	RNA binding motif protein, X chromosome	Rbmx	4,58
1425527_at	paired related homeobox 1	Prrx1	3,80
1423633_at	RIKEN cDNA 6530403A03 gene	6530403A03Rik	4,52
1448932_at	keratin complex 1, acidic, gene 16	Krt1-16	3,34
1422476_at	interferon gamma inducible protein 30	Ifi30	3,80
1427276_at	SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1 (yeast)	Smc4l1	4,47
1450203_at	SET and MYND domain containing 1	Smyd1	3,71
1452612_at	zinc finger protein 294	Zfp294	3,98
1452217_at	AHNAK nucleoprotein (desmoyokin)	Ahnak	3,68
1426981_at	proprotein convertase subtilisin/kexin type 6	Pcsk6	4,69
1451793_at	kelch-like 24 (Drosophila)	Klhl24	5,71
1439214_a_at	apoptosis inhibitor 5	Api5	4,76
1418819_at	ADP-ribosylation factor-like 10C	Arl10c	4,90
1430634_a_at	phosphofructokinase, platelet	Pfkip	4,44
1422568_at	nuclear distribution gene E-like homolog 1 (A. nidulans)	Ndel1	3,49
1452772_at	tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase 2	Tnks2	4,93
1421916_at	platelet derived growth factor receptor, alpha polypeptide	Pdgfra	4,53
1450460_at	aquaporin 3	Aqp3	3,65
1424280_at	motile sperm domain containing 1	Mospd1	3,74
1451415_at	RIKEN cDNA 1810011O10 gene	1810011O10Rik	3,60
1427424_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 6	Galnt6	5,01
1422900_at	meningioma expressed antigen 5 (hyaluronidase)	Mgea5	3,59
1417063_at	complement component 1, q subcomponent, beta polypeptide	C1qb	3,87
1437277_x_at	transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	4,95
1451754_a_at	WD repeat domain 45	Wdr45	4,94
1418169_at	zinc finger, CCHC domain containing 14	Zcchc14	4,11
1434608_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 52	Ddx52	4,38
1451943_a_at	protein phosphatase 1A, magnesium dependent, alpha isoform	Ppm1a	5,10
1417483_at	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	Nfkbiz	4,04
1426195_a_at	cystatin C	Cst3	4,01
1448042_s_at	ring finger protein 2	Rnf2	4,71
1426641_at	tribbles homolog 2 (Drosophila)	Trib2	5,52
1455900_x_at	transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	5,10
1425022_at	ubiquitin specific peptidase 3	Usp3	4,37
1418067_at	cofilin 2, muscle	Cfl2	3,72
1418609_at	interleukin 1 family, member 6	Il1f6	3,59
1425508_s_at	ADP-ribosylation factor related protein 1	Arfrp1	3,42
1449615_s_at	high density lipoprotein (HDL) binding protein	Hdlbp	3,49
1424034_at	RAR-related orphan receptor alpha	Rora	4,21
1429379_at	extra cellular link domain-containing 1	Xlkd1	3,75
1422454_at	keratin complex 1, acidic, gene 13	Krt1-13	4,21
1451388_a_at	ATPase, Class VI, type 11B	Atp11b	4,26

1460192_at	oxysterol binding protein-like 1A	Osbp1a	5,03
1425609_at	neutrophil cytosolic factor 1	Ncf1	4,76
1422981_at	DiGeorge syndrome critical region gene 8	Dgcr8	5,57
1415900_a_at	kit oncogene	Kit	4,70
1418452_at	guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2 subunit	Gng2	4,87
1431530_a_at	tetraspanin 5	Tspan5	5,34
1422779_at	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	Smpd3	4,88
1415874_at	sprouty homolog 1 (Drosophila)	Spry1	5,08
1426169_a_at	linker for activation of T cells family, member 2	Lat2	3,53
1423699_at	DNA segment, Chr 15, ERATO Doi 785, expressed	D15Ertd785e	4,85
1419420_at	(alpha-N-acetyl-neuraminy-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 5	St6galnac5	4,61
1451241_at	laminin B1 subunit 1	Lamb1-1	4,93
1417664_a_at	N-myc downstream regulated gene 3	Ndr3	4,74
1421809_at	DiGeorge syndrome critical region gene 2	Dgcr2	4,55
1448827_s_at	myosin, heavy polypeptide 6, cardiac muscle, alpha /// myosin, heavy polypeptide 7, cardiac muscle, beta	Myh6 /// Myh7	5,08
1417273_at	pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 4	Pdk4	4,94
1420590_at	hyaluronan synthase1	Has1	3,44
1435949_at	zinc finger CCCH type containing 3	Zc3h3	4,29
1450273_at	interleukin 1 receptor-like 2	Il1rl2	4,71
1420460_a_at	peroxisomal biogenesis factor 11b	Pex11b	4,78
1451335_at	placenta-specific 8	Plac8	4,28
1415730_at	RIKEN cDNA 5730453I16 gene	5730453I16Rik	3,64
1427716_at	RIKEN cDNA 1700036D21 gene	1700036D21Rik	5,33
1419091_a_at	annexin A2	Anxa2	4,55
1452686_s_at	DNA segment, Chr 4, ERATO Doi 196, expressed	D4Ertd196e	3,66
1428361_x_at	hemoglobin alpha, adult chain 1	Hba-a1	3,47
1421298_a_at	homeodomain interacting protein kinase 1	Hipk1	4,94
1423720_a_at	SAR1a gene homolog 1 (S. cerevisiae)	Sara1	4,70
1436498_at	ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein homolog 1 (Drosophila)	Arih1	4,26
1417205_at	KDEL (Lys-Asp-Glu-Leu) endoplasmic reticulum protein retention receptor 2	Kdelr2	4,20
1420537_at	potassium channel tetramerisation domain containing 4	Kctd4	4,81
1437044_a_at	glucosidase, beta, acid	Gba	4,82
1451047_at	integral membrane protein 2A	Itm2a	3,59
1417851_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 13	Cxcl13	3,71
1454967_at	RIKEN cDNA A930001N09 gene (A930001N09Rik), mRNA	A930001N09Rik	3,78
1417502_at	tetraspanin 7	Tspan7	3,33
1424735_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 25	Slc25a25	4,90
1420953_at	adducin 1 (alpha)	Add1	4,12
1452027_a_at	transformation related protein 63	Trp63	5,03
1421011_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 8	Dhrs8	4,24
1420491_at	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 alpha	Eif2s1	4,47

1451794_at	transmembrane and coiled coil domains 3	Tmcc3	5,39
1451201_s_at	ribonuclease/angiogenin inhibitor 1	Rnh1	4,37
1420862_at	dynactin 4	Dctn4	4,20
1425344_at	RIKEN cDNA 4430402O11 gene	4430402O11Rik	3,85
1433589_at	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 116, expressed	D6Wsu116e	4,99
1419994_s_at	DNA segment, Chr 10, ERATO Doi 641, expressed	D10Ert641e	3,90
1416194_at	cytochrome P450, family 4, subfamily b, polypeptide 1	Cyp4b1	4,51
1454713_s_at	histidine decarboxylase	Hdc	3,52
1425789_s_at	annexin A8	Anxa8	4,38
1460634_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator	Ralgds	4,92
1452638_s_at	dynamamin 1-like	Dnm1l	5,18
1417462_at	CAP, adenylate cyclase-associated protein 1 (yeast)	Cap1	4,88
1419635_at	RIKEN cDNA 4833420G17 gene	4833420G17Rik	3,82
1425666_at	zinc finger protein of the cerebellum 5	Zic5	4,70
1420533_at	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	Gucy1a3	4,39
1460646_at	casein kinase II, alpha 2, polypeptide	Csnk2a2	4,64
1450379_at	moesin	Msn	4,49
1425656_a_at	brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein 2	Baiap2	5,21
1435026_at	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 2	Spock2	3,81
1431057_a_at	protease, serine, 23	Prss23	3,99
1416203_at	aquaporin 1	Aqp1	3,74
1420899_at	RAB18, member RAS oncogene family	Rab18	4,69
1422240_s_at	small proline-rich protein 2H	Sprr2h	3,70
1419248_at	regulator of G-protein signaling 2	Rgs2	4,28
1449937_at	placental protein 11 related	Pp11r	4,11
1417426_at	proteoglycan 1, secretory granule	Prg1	3,72
1427891_at	GTPase, IMAP family member 6	Gimap6	3,82
1449878_a_at	solute carrier family 12, member 6	Slc12a6	5,18
1452391_at	coxsackievirus and adenovirus receptor	Cxadr	3,95
1450633_at	calmodulin 4	Calm4	4,00
1416039_x_at	cysteine rich protein 61	Cyr61	4,36
1448748_at	pleckstrin	Plek	3,45
1434271_at	glucosidase beta 2	Gba2	4,99
1423986_a_at	scotin gene	MGI:1915044	4,23
1448215_a_at	dipeptidylpeptidase 3	Dpp3	4,97
1416318_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 1a	Serpinb1a	3,39
1416338_at	SH3-domain GRB2-like 1	Sh3gl1	4,59
1415728_at	poly(A) binding protein, nuclear 1	Pabpn1	5,57
1416924_at	brain protein I3	Bri3	3,99
1424264_at	mediator of RNA polymerase II transcription, subunit 6 homolog (yeast)	Med6	4,13
1455868_a_at	tubulin, gamma complex associated protein 2	Tubgcp2	5,00
1420046_s_at	MAF1 homolog (S. cerevisiae)	Maf1	4,43
1448494_at	growth arrest specific 1	Gas1	3,73

1437103_at	RIKEN cDNA C330012H03 gene	C330012H03Rik	4,00
1451726_at	myotubularin related protein 6	Mtmr6	4,71
1428966_at	RIKEN cDNA 2610204K14 gene	2610204K14Rik	5,00
1449073_at	filamin C, gamma (actin binding protein 280)	Flnc	4,24
1429040_at	RIKEN cDNA 2610005L07 gene	2610005L07Rik	3,88
1421721_a_at	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator	Arnt	4,61
1421193_a_at	pre B-cell leukemia transcription factor 3	Pbx3	4,33
1448309_at	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	Ap3m1	3,88
1434469_at	OTU domain containing 4	Otud4	5,04
1417487_at	fos-like antigen 1	Fosl1	3,93
1418972_at	B-cell leukemia/lymphoma 10	Bcl10	4,77
1450898_at	hippocampus abundant gene transcript 1	Hiat1	3,66
1422680_at	SH2 domain binding protein 1 (tetratricopeptide repeat containing)	Sh2bp1	3,85
1417509_at	ring finger protein (C3HC4 type) 19	Rnf19	4,34
1450099_a_at	glucosidase, beta, acid	Gba	4,57
1425713_a_at	ring finger protein 146	Rnf146	4,81
1426600_at	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	Slc2a1	3,43
1423141_at	lysosomal acid lipase 1	Lip1	4,12
1424199_at	SEH1-like (S. cerevisiae)	Seh1l	4,58
1434181_at	pleckstrin homology domain containing, family C (with FERM domain) member 1	Plekhc1	4,15
1450971_at	growth arrest and DNA-damage-inducible 45 beta	Gadd45b	4,02
1417014_at	heat shock 27kDa protein 8	Hspb8	4,98
1417109_at	tubulointerstitial nephritis antigen-like	Tinagl	4,07
1431359_a_at	RIKEN cDNA 1110007C09 gene	1110007C09Rik	5,32
1419621_at	ankyrin repeat domain 2 (stretch responsive muscle)	Ankrd2	4,26
1460278_a_at	DNA segment, Chr 15, Wayne State University 75, expressed	D15Wsu75e	5,46
1415888_at	hepatoma-derived growth factor	Hdgf	4,35
1421448_at	GTPase activating RANGAP domain-like 1	Garnl1	3,67
1451839_a_at	phosphodiesterase 7A	Pde7a	4,51
1448534_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	Ptpns1	4,92
1431030_a_at	ring finger protein 14	Rnf14	3,58
1426379_at	eukaryotic translation initiation factor 4B	Eif4b	4,22
1416505_at	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 1	Nr4a1	5,13
1416488_at	cyclin G2	Ccng2	3,99
1426179_a_at	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	Twsg1	4,91
1418862_at	enoyl Coenzyme A hydratase domain containing 3	Echdc3	4,98
1426899_at	RIKEN cDNA 4930451A13 gene	4930451A13Rik	4,18
1423502_at	bromodomain containing 2	Brd2	5,13
1431339_a_at	EF hand domain containing 2	Efh2	4,80
1421797_a_at	sorting nexin 12	Snx12	4,69
1420991_at	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)	Ankrd1	5,32
1425630_at	transcriptional regulator, SIN3B (yeast)	Sin3b	5,14

1421843_at	interleukin 1 receptor accessory protein	Il1rap	5,03
1416501_at	3-phosphoinositide dependent protein kinase-1	Pdpk1	4,16
1427226_at	epsin 2	Epn2	5,14
1453960_a_at	capping protein (actin filament) muscle Z-line, beta	Capzb	3,62
1427980_at	RIKEN cDNA 4933407C03 gene	4933407C03Rik	4,75
1424195_a_at	inositol polyphosphate-5-phosphatase D	Inpp5d	4,43
1421290_at	heat shock protein family, member 7 (cardiovascular)	Hspb7	4,03
1435881_at	poly(rC) binding protein 2	Pcbp2	4,10
1448898_at	chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	5,43
1420835_at	solute carrier family 25, member 30	Slc25a30	4,91
1426010_a_at	erythrocyte protein band 4.1-like 3	Epb4.1l3	4,55
1422401_at	small proline-rich protein 3	Sprr3	4,73
1420892_at	wingless-related MMTV integration site 7B	Wnt7b	4,13
1422470_at	BCL2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 1, NIP3	Bnip3	4,18
1417341_a_at	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 2	Ppp1r2	4,29
1425066_a_at	RIKEN cDNA 1110061O04 gene	1110061O04Rik	4,77
1431744_a_at	stromal membrane-associated protein 1	Smap1	5,31
1427430_at	expressed sequence AI848100	AI848100	4,95
1418758_a_at	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 3	Pscd3	3,64
1425862_a_at	phosphatidylinositol 3-kinase, C2 domain containing, alpha polypeptide	Pik3c2a	5,26
1450505_a_at	RIKEN cDNA 1810015C04 gene	1810015C04Rik	4,50
1422180_a_at	mast cell protease 6	Mcpt6	3,81
1416691_at	GTP binding protein 2	Gtpbp2	4,50
1423658_at	signal peptide peptidase 3	Sppl3	5,27
1424332_at	Rab40c, member RAS oncogene family	Rab40c	5,00
1435626_a_at	homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	Herpud1	5,26
1454904_at	X-linked myotubular myopathy gene 1	Mtm1	4,25
1455013_at	ariadne homolog 2 (Drosophila)	Arih2	5,46
1422766_at	stau1 (RNA binding protein) homolog 1 (Drosophila)	Stau1	5,18
1449175_at	G-protein coupled receptor 65	Gpr65	3,83
1434832_at	forkhead box O3a	Foxo3a	3,67
1448399_at	Tax1 (human T-cell leukemia virus type I) binding protein 1	Tax1bp1	5,40
1419372_at	golgi SNAP receptor complex member 2	Gosr2	4,12
1460735_at	supervillin	Svil	4,31
1423961_at	WD repeat domain 26, mRNA (cDNA clone IMAGE:4018743)	Wdr26	4,53
1417397_at	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 1	Slc9a1	3,78
1419103_a_at	abhydrolase domain containing 6	Abhd6	3,93
1459985_at	WD repeat domain 61	Wdr61	4,35
1448302_at	RIKEN cDNA 2410004N11 gene	2410004N11Rik	5,77
1451802_at	mast cell protease 6	Mcpt6	4,59
1451796_s_at	histidine decarboxylase	Hdc	3,49
1450119_at	dystonin	Dst	5,05

1424942_a_at	myelocytomatosis oncogene	Myc	5,42
1450748_at	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	Smpd3	5,49
1449029_at	MAP kinase-interacting serine/threonine kinase 2	Mknk2	4,31
1427574_s_at	SH3 domain protein D19	Sh3d19	4,24
1420841_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	Ptprf	4,11
1420954_a_at	adducin 1 (alpha)	Add1	4,08
1420472_at	myotrophin	Mtpn	3,99
1450104_at	a disintegrin and metallopeptidase domain 10	Adam10	5,00
1448966_a_at	nuclear factor of activated T-cells 5	Nfat5	4,52
1421057_at	deoxyribonuclease 1-like 3	Dnase1l3	4,20
1422637_at	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5	Rassf5	5,09
1435697_a_at	pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein	Pscdbp	4,26
1428306_at	DNA-damage-inducible transcript 4	Ddit4	4,09
1452742_at	RIKEN cDNA 2310001H13 gene	2310001H13Rik	4,32
1432646_a_at	RIKEN cDNA 2900097C17 gene	2900097C17Rik	4,50
1426565_at	insulin-like growth factor I receptor	Igf1r	5,22
1448183_a_at	hypoxia inducible factor 1, alpha subunit	Hif1a	4,90
1426337_a_at	TEA domain family member 4	Tead4	5,19
1449450_at	prostaglandin E synthase	Ptges	4,97
1415795_at	spindlin	Spin	5,48
1421040_a_at	glutathione S-transferase, alpha 2 (Yc2)	Gsta2	3,91
1424724_a_at	DNA segment, Chr 16, ERATO Doi 472, expressed	D16Ertd472e	5,06
1452345_at	leiomodulin 2 (cardiac)	Lmod2	5,20
1451742_a_at	UDP-glucose pyrophosphorylase 2	Ugp2	3,84
1429533_at	inner membrane protein, mitochondrial	Immt	3,90
1416482_at	tetratricopeptide repeat domain 3	Ttc3	4,62
1448410_at	ubiquitination factor E4B, UFD2 homolog (S. cerevisiae)	Ube4b	4,95
1423689_a_at	G-protein signalling modulator 1 (AGS3-like, C. elegans)	Gpsm1	5,20
1420884_at	sarcolipin	Sln	3,99
1423718_at	adenylate kinase 3	Ak3	4,24
1421952_at	calpain 6	Capn6	3,49
1427021_s_at	ferritin heavy chain 1 /// dipeptidase 2	Fth1 /// Dpep2	4,17
1435012_x_at	elastase 3B, pancreatic	Ela3b	4,36
1449449_at	prostaglandin E synthase	Ptges	5,19
1416927_at	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	Trp53inp1	5,13
1449877_s_at	kinesin family member C1	Kifc1	5,56
1450234_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6C	Ms4a6c	4,52
1432478_a_at	IBR domain containing 3	Ibrdc3	5,08
1423571_at	endothelial differentiation sphingolipid G-protein-coupled receptor 1	Edg1	4,66
1421471_at	neuropeptide Y receptor Y1	Npy1r	4,61
1419874_x_at	zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	4,25
1416252_at	serine/threonine kinase 38	Stk38	3,99
1421302_a_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 15	Gna15	5,69

1417176_at	casein kinase 1, epsilon	Csnk1e	4,87
1423661_s_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2	Ctdsp2	4,25
1421908_a_at	transcription factor 12	Tcf12	4,96
1424683_at	RIKEN cDNA 1810015C04 gene	1810015C04Rik	4,49
1417327_at	caveolin 2	Cav2	4,42
1418507_s_at	RIKEN cDNA D130043N08 gene	D130043N08Rik	4,38
1435572_at	RIKEN cDNA 2310014L17 gene	2310014L17Rik	4,27
1415996_at	thioredoxin interacting protein	Txnip	4,21
1418266_at	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	Alox12b	5,17
1424355_a_at	transcriptional regulator, SIN3B (yeast)	Sin3b	5,07
1419722_at	protease, serine, 19 (neuropsin)	Prss19	4,80
1421813_a_at	prosaposin	Psap	4,23
1451775_s_at	interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	5,23
1437145_s_at	RIKEN cDNA 2310002J15 gene	2310002J15Rik	4,41
1418707_at	BCL2-associated athanogene 4	Bag4	4,54
1423886_at	laminin, gamma 1	Lamc1	4,84
1451911_a_at	angiotensin I converting enzyme (peptidyl-dipeptidase A) 1	Ace	4,19
1448335_s_at	cyclin I	Ccni	4,74
1425620_at	transforming growth factor, beta receptor III	Tgfb3	4,55
1419208_at	mitogen activated protein kinase kinase kinase 8	Map3k8	4,62
1434644_at	transducin (beta)-like 1 X-linked	Tbl1x	4,40
1449300_at	CTTNBP2 N-terminal like	Ctnnbp2nl	5,28
1452499_a_at	kinesin family member 2A	Kif2a	5,15
1431686_a_at	glia maturation factor, beta	Gmfb	5,82
1429144_at	RIKEN cDNA 2310032D16 gene	2310032D16Rik	4,35
1416304_at	LPS-induced TN factor	Litaf	5,04
1422969_s_at	inositol hexaphosphate kinase 1	Ihpk1	4,58
1417707_at	RIKEN cDNA B230342M21 gene	B230342M21Rik	4,40
1425461_at	F-box and WD-40 domain protein 11	Fbxw11	4,96
1423413_at	N-myc downstream regulated gene 1	Ndr1	5,01
1419099_x_at	stomatin	Stom	4,51
1427739_a_at	transformation related protein 53	Trp53	4,60
1418097_a_at	transmembrane phosphoinositide 3-phosphatase and tensin homolog 2	Tpte2	4,10
1421976_at	matrix metalloproteinase 19	Mmp19	5,27
1431655_a_at	multiple substrate lipid kinase	Mulk	4,84
1421415_s_at	glucosaminyl (N-acetyl) transferase 2, I-branching enzyme	Gcnt2	4,72
1452348_s_at	interferon activated gene 204 /// interferon activated gene 205 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen	Ifi202, 05 /// Mnda	4,91
1438163_x_at	---	---	4,02
1425988_a_at	homeodomain interacting protein kinase 1	Hipk1	5,13
1438999_a_at	nuclear factor of activated T-cells 5	Nfat5	4,56
1416374_at	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	Ap3m1	4,45
1422896_at	vesicle-associated membrane protein 4	Vamp4	4,27

1418973_at	basic leucine zipper nuclear factor 1	Blzf1	4,63
1417639_at	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 4	Slc22a4	3,87
1423297_at	adducin 3 (gamma)	Add3	4,95
1419532_at	interleukin 1 receptor, type II	Il1r2	5,26
1419201_at	RIKEN cDNA 2310015I08 gene	2310015I08Rik	4,42
1434333_a_at	protein kinase D2	Prkd2	4,13
1422943_a_at	heat shock protein 1	Hspb1	4,53
1448529_at	thrombomodulin	Thbd	4,82
1460337_at	SH3-domain kinase binding protein 1	Sh3kbp1	5,30
1425933_a_at	5'-nucleotidase, cytosolic II	Nt5c2	5,25
1421880_at	myotubularin related protein 1	Mtmr1	4,95
1427188_at	ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein homolog 1 (Drosophila)	Arih1	4,99
1420873_at	protein tyrosine kinase 9	Ptk9	3,87
1460650_at	ATPase, H+ transporting, lysosomal V0 subunit a isoform 1	Atp6v0a1	4,61
1451270_at	dual specificity phosphatase 18	Dusp18	5,77
1452997_at	RIKEN cDNA 2610005L07 gene	2610005L07Rik	3,99
1420894_at	transforming growth factor, beta receptor I	Tgfb1	5,15
1422101_at	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 23	Tnfrsf23	4,50
1422690_at	serine palmitoyltransferase, long chain base subunit 1	Sptlc1	5,32
1416019_at	down-regulator of transcription 1	Dr1	4,74
1417955_at	RIKEN cDNA 2600016J21 gene	2600016J21Rik	3,84
1421268_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	Ugcg	5,34
1449554_at	transducin-like enhancer of split 3, homolog of Drosophila E(spl)	Tle3	5,50
1427768_s_at	myosin, light polypeptide 3	Myl3	4,58
1421413_a_at	PDZ and LIM domain 5	Pdlim5	4,46
1449460_at	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 13	Asb13	4,90
1450641_at	vimentin	Vim	5,22
1423652_at	HESB like domain containing 2	Hbld2	4,23
1416308_at	UDP-glucose dehydrogenase	Ugdh	4,94
1450845_a_at	basic leucine zipper and W2 domains 1	Bzw1	5,61
1450413_at	platelet derived growth factor, B polypeptide	Pdgfb	4,59
1452352_at	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	Ctla2b	5,29
1421117_at	dystonin	Dst	4,73
1448228_at	lysyl oxidase	Lox	5,05
1418231_at	LIM and senescent cell antigen-like domains 1	Lims1	4,25
1451956_a_at	opioid receptor, sigma 1	Oprs1	4,62
1450259_a_at	signal transducer and activator of transcription 5A	Stat5a	4,57
1427896_at	RIKEN cDNA 2400003N08 gene	2400003N08Rik	4,36
1416871_at	a disintegrin and metallopeptidase domain 8	Adam8	4,30
1450157_a_at	hyaluronan mediated motility receptor (RHAMM)	Hmmr	4,64
1427174_at	RIKEN cDNA 3100002L24 gene /// hypothetical LOC329575	3100002L24Rik	4,28
1453865_a_at	OTU domain containing 5	Otud5	5,27

1450519_a_at	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, alpha	Prkaca	3,75
1428781_at	RIKEN cDNA 1110014F24 gene	1110014F24Rik	4,43
1460164_at	spindlin	Spin	4,35
1426063_a_at	GTP binding protein (gene overexpressed in skeletal muscle)	Gem	4,77
1456080_a_at	tumor differentially expressed 1	Tde1	5,29
1450138_a_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6a	Serpinb6a	5,04
1434134_at	WD repeat domain 42A	Wdr42a	4,87
1423368_at	lysosomal-associated protein transmembrane 4A	Laptm4a	3,86
1452032_at	protein kinase, cAMP dependent regulatory, type I, alpha	Prkar1a	4,50
1436042_at	talin 1	Tln1	4,85
1427159_at	cleavage and polyadenylation factor subunit homolog (S. cerevisiae)	Pcf11	4,88
1423094_at	cereblon	Crbn	4,63
1450399_at	presenilin 1	Psen1	5,44
1425896_a_at	fibrillin 1	Fbn1	4,48
1418288_at	lipin 1	Lpin1	4,90
1427638_at	zinc finger and BTB domain containing 16	Zbtb16	4,78
1417500_a_at	transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	4,39
1417874_at	TMEM9 domain family, member B	Tmem9b	5,29
1453731_a_at	transmembrane protein 77	Tmem77	4,85
1453572_a_at	proteolipid protein 2	Plp2	4,74
1421853_at	presenilin 1	Psen1	4,72
1423041_a_at	basic leucine zipper and W2 domains 1	Bzw1	5,25
1456199_x_at	RAN binding protein 9	Ranbp9	4,87
1424051_at	procollagen, type IV, alpha 2	Col4a2	4,45
1426538_a_at	transformation related protein 53	Trp53	4,66
1426555_at	serine carboxypeptidase 1	Scpep1	4,96
1449556_at	histocompatibility 2, T region locus 23	H2-T23	3,88
1460393_a_at	dual specificity phosphatase 7	Dusp7	5,14
1426401_at	protein phosphatase 3, catalytic subunit, alpha isoform	Ppp3ca	5,31
1424109_a_at	glyoxalase 1	Glo1	4,88
1449145_a_at	caveolin, caveolae protein 1	Cav1	4,79
1420583_a_at	RAR-related orphan receptor alpha	Rora	5,68
1455626_at	homeo box A9	Hoxa9	4,69
1427471_at	F-box and leucine-rich repeat protein 3	Fbxl3	5,28
1450010_at	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 12	Hsd17b12	4,14
1427221_at	X transporter protein 3 similar 1 gene	MGI:2143217	4,96
1419647_a_at	immediate early response 3	Ier3	4,14
1416811_s_at	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha /// cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 beta	Ctla2a /// Ctla2b	4,22
1420760_s_at	N-myc downstream regulated-like	Ndr1	3,86
1460351_at	S100 calcium binding protein A11 (calizzarin)	S100a11	5,62
1448469_at	nidogen 1	Nid1	4,78
1427355_at	calcitonin/calcitonin-related polypeptide, alpha	Calca	4,17
1421604_a_at	Kruppel-like factor 3 (basic)	Klf3	4,24

1420920_a_at	ADP-ribosylation factor 1	Arf1	4,41
1421252_a_at	myocyte enhancer factor 2A	Mef2a	4,58
1451987_at	arrestin, beta 2	Arrb2	5,22
1460302_at	thrombospondin 1	Thbs1	4,48
1421571_a_at	lymphocyte antigen 6 complex, locus C	Ly6c	4,69
1434227_at	---	---	5,12
1423660_at	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 2	Ctdsp2	3,96
1426359_at	zinc finger CCCH type containing 11A	Zc3h11a	4,08
1426831_at	S-adenosylhomocysteine hydrolase-like 1	Ahcyl1	5,15
1427580_a_at	RNA imprinted and accumulated in nucleus	Rian	3,90
1437626_at	zinc finger protein 36, C3H type-like 2	Zfp36l2	3,89
1453604_a_at	Hbs1-like (S. cerevisiae)	Hbs1l	5,40
1419168_at	mitogen-activated protein kinase 6	Mapk6	5,79
1418399_at	potassium channel tetramerisation domain containing 9	Kctd9	5,54
1433805_at	Janus kinase 1	Jak1	4,23
1451054_at	orosomucoid 1	Orm1	5,23
1417576_a_at	OTU domain, ubiquitin aldehyde binding 2	Otub2	4,56
1417936_at	chemokine (C-C motif) ligand 9	Ccl9	5,13
1428288_at	RIKEN cDNA 2310051E17 gene	2310051E17Rik	4,65
1427763_a_at	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, delta	Camk2d	5,39
1421276_a_at	dystonin	Dst	5,97
1460643_at	elongation factor RNA polymerase II	Ell	4,65
1425931_a_at	aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator-like 2	Arntl2	5,18
1418826_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6B	Ms4a6b	4,19
1416188_at	GM2 ganglioside activator protein	Gm2a	5,58
1424225_at	ankyrin repeat and SOCS box-containing protein 8	Asb8	4,14
1436717_x_at	hemoglobin Y, beta-like embryonic chain	Hbb-y	4,66
1455836_at	poly (A) polymerase alpha	Papola	4,61
1421832_at	twisted gastrulation homolog 1 (Drosophila)	Twsg1	4,96
1425543_s_at	pleckstrin homology domain containing, family A member 5	Plekha5	4,67
1451908_a_at	SEC14-like 1 (S. cerevisiae)	Sec14l1	5,36
1448456_at	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	Cln8	5,45
1450936_a_at	deoxyribonuclease 1-like 2	Dnase1l2	4,17
1451658_a_at	polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide C	Polr3c	5,66
1419191_at	homeodomain interacting protein kinase 3	Hipk3	4,38
1418748_at	caspase 14	Casp14	5,50
1448306_at	nuclear factor of kappa light chain gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	Nfkbia	4,64
1419097_a_at	stomatin	Stom	4,66
1448167_at	interferon gamma receptor 1	Ifngr1	5,16
1420535_a_at	RIKEN cDNA 6330412F12 gene	6330412F12Rik	5,63
1436823_x_at	hemoglobin Y, beta-like embryonic chain	Hbb-y	4,33
1453740_a_at	cyclin L2	Ccnl2	4,12
1448152_at	insulin-like growth factor 2	Igf2	5,08

1450105_at	a disintegrin and metallopeptidase domain 10	Adam10	4,38
1448490_at	aarF domain containing kinase 4	Adck4	5,86
1426576_at	transmembrane protein 23	Tmem23	4,29
1421900_at	eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 1	Eif2ak1	5,04
1416756_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 1	Dnajb1	5,96
1421056_at	deoxyribonuclease 1-like 3	Dnase1l3	4,96
1450786_x_at	PDZ and LIM domain 5	Pdlim5	5,39
1423937_at	potassium channel tetramerisation domain containing 5	Kctd5	5,22
1419927_s_at	RAB interacting factor	Rabif	4,15
1418703_at	RNA binding motif, single stranded interacting protein 1	Rbms1	5,46
1415881_at	growth hormone inducible transmembrane protein	Ghitm	5,08
1426348_at	procollagen, type IV, alpha 1	Col4a1	4,27
1435518_at	RAS related protein 1b	Rap1b	4,71
1448952_at	RIKEN cDNA A030009H04 gene	A030009H04Rik	4,97
1448239_at	heme oxygenase (decycling) 1	Hmox1	4,87
1424960_at	epsin 3	Epn3	4,87
1416034_at	CD24a antigen	Cd24a	4,72
1448745_s_at	loricrin	Lor	5,83
1422959_s_at	zinc finger protein 313	Zfp313	4,59
1448348_at	GPI-anchored membrane protein 1	Gpiap1	4,06
1450015_x_at	sphingosine-1-phosphate phosphatase 1	Sgpp1	5,58
1449425_at	wingless-related MMTV integration site 2	Wnt2	4,49
1451064_a_at	phosphoserine aminotransferase 1	Psat1	5,04
1451876_a_at	transformation related protein 63	Trp63	4,99
1421287_a_at	platelet/endothelial cell adhesion molecule 1	Pecam1	4,96
1422002_at	MAX dimerization protein 1	Mxd1	4,83
1424254_at	interferon induced transmembrane protein 1	Ifitm1	4,10
1421839_at	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	Abca1	4,63
1426343_at	RIKEN cDNA 1300006C19 gene	1300006C19Rik	4,34
1415703_at	HECT, UBA and WWE domain containing 1	Huwe1	5,55
1452016_at	arachidonate 5-lipoxygenase activating protein	Alox5ap	4,96
1420998_at	ets variant gene 5	Etv5	4,00
1425732_a_at	Max interacting protein 1	Mxi1	5,70
1425107_a_at	leukemia inhibitory factor receptor	Lifr	5,10
1419247_at	regulator of G-protein signaling 2	Rgs2	5,17
1425418_at	WAP four-disulfide core domain 5	Wfdc5	5,10
1449496_at	RIKEN cDNA 2010109I03 gene	2010109I03Rik	5,38
1442025_a_at	---	---	4,34
1426434_at	transmembrane protein 43	Tmem43	5,17
1421315_s_at	cortactin	Ctnn	4,59
1425811_a_at	cysteine and glycine-rich protein 1	Csrp1	5,50
1423120_at	insulin degrading enzyme	Idc	4,15
1423396_at	angiotensinogen (serpin peptidase inhibitor, clade A, member 8)	Agt	5,28

1422102_a_at	signal transducer and activator of transcription 5B	Stat5b	4,69
1416250_at	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Btg2	5,05
1416157_at	vinculin	Vcl	4,90
1415929_at	microtubule-associated protein 1 light chain 3 beta	Map1lc3b	4,52
1427345_a_at	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1	Sult1a1	4,42
1419674_a_at	dipeptidase 1 (renal)	Dpep1	4,65
1426802_at	septin 8		5,60
1427537_at	epiplakin 1	Eppk1	4,46
1422428_at	acyl-CoA synthetase bubblegum family member 1	Acsbg1	5,62
1438961_s_at	bleomycin hydrolase	Blmh	5,10
1450470_at	---	---	4,26
1452461_a_at	hypothetical LOC432486	MGC79224	5,12
1434393_at	ubiquitin specific peptidase 34	Usp34	4,75
1421955_a_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	Nedd4	4,60
1426574_a_at	adducin 3 (gamma)	Add3	5,28
1426184_a_at	programmed cell death 6 interacting protein	Pdcd6ip	5,01
1419816_s_at	ERBB receptor feedback inhibitor 1	Errfi1	5,45
1427358_a_at	death associated protein kinase 1	Dapk1	5,09
1424123_at	cDNA sequence BC011209	BC011209	4,26
1425204_s_at	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19a /// DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 19b	Ddx19a /// Ddx19b	4,72
1437938_x_at	dynamin 2	Dnm2	4,57
1452080_a_at	DCUN1D1 DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (S. cerevisiae)	Dcun1d1	5,40
1416061_at	TBC1 domain family, member 15	Tbc1d15	4,71
1418675_at	oncostatin M receptor	Osmr	5,23
1419431_at	epiregulin	Ereg	4,45
1427483_at	solute carrier family 25 (mitochondrial carrier, phosphate carrier), member 24	Slc25a24	5,22
1415997_at	thioredoxin interacting protein	Txnip	5,16
1420607_at	RNA binding motif protein 18	Rbm18	4,93
1425855_a_at	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)	Crk	5,22
1452103_at	RIKEN cDNA 2600005N12 gene	2600005N12Rik	5,22
1426236_a_at	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	Glul	4,98
1422007_at	aquaporin 3	Aqp3	5,19
1423100_at	FBJ osteosarcoma oncogene	Fos	4,54
1420796_at	aryl-hydrocarbon receptor repressor	Ahrr	5,00
1417268_at	CD14 antigen	Cd14	4,76
1421143_at	diaphanous homolog 1 (Drosophila)	Diap1	5,58
1428289_at	Kruppel-like factor 9	Klf9	4,94
1426884_at	RIKEN cDNA 1110007A06 gene	1110007A06Rik	4,93
1418155_at	---	---	5,13
1423905_at	poliovirus receptor	Pvr	5,11
1417787_at	dickkopf-like 1	Dkk1	5,16
1422788_at	solute carrier family 43, member 3	Slc43a3	5,61

1418369_at	DNA primase, p49 subunit	Prim1	4,23
1450396_at	stromal antigen 2	Stag2	5,43
1448864_at	SNF related kinase	Snrk	4,46
1417633_at	superoxide dismutase 3, extracellular	Sod3	4,95
1453721_a_at	solute carrier family 31, member 2	Slc31a2	4,50
1427298_at	dynamin 3, opposite strand	Dnm3os	5,09
1423233_at	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	Cebpd	4,45
1416268_at	E26 avian leukemia oncogene 2, 3' domain	Ets2	4,41
1448889_at	solute carrier family 38, member 4	Slc38a4	4,68
1456481_at	DNA segment, Chr 9, ERATO Doi 280, expressed	D9Ertd280e	5,14
1416504_at	Unc-51 like kinase 1 (C. elegans)	Ulk1	4,27
1433724_at	DNA segment, Chr 15, ERATO Doi 621, expressed	D15Ertd621e	5,71
1452079_s_at	DCUN1D1 DCN1, defective in cullin neddylation 1, domain containing 1 (S. cerevisiae)	Dcun1d1	5,34
1423754_at	interferon induced transmembrane protein 3	Ifitm3	4,25
1451109_a_at	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated gene 4	Nedd4	4,51
1451717_s_at	SUMO/sentrin specific peptidase 2	Senp2	5,65
1421173_at	interferon regulatory factor 4	Irf4	5,05
1421065_at	Janus kinase 2	Jak2	5,43
1438264_a_at	tripeptidyl peptidase II	Tpp2	5,27
1460367_at	high mobility group box transcription factor 1	Hbp1	4,99
1422573_at	AMP deaminase 3	Ampd3	5,17
1453470_a_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	Gna13	5,12
1452097_a_at	dual specificity phosphatase 7	Dusp7	5,62
1450532_at	RIKEN cDNA 2310002J15 gene	2310002J15Rik	5,27
1426146_a_at	choline phosphotransferase 1	Chpt1	4,19
1453768_a_at	RIKEN cDNA 5430432M24 gene	5430432M24Rik	5,19
1423586_at	AXL receptor tyrosine kinase	Axl	5,88
1448455_at	ceroid-lipofuscinosis, neuronal 8	Cln8	5,45
1422603_at	ribonuclease, RNase A family 4	Rnase4	4,79
1448950_at	interleukin 1 receptor, type I	Il1r1	5,23
1427189_at	ariadne ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein homolog 1 (Drosophila)	Arih1	5,75
1431680_a_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, K	Ptprk	4,87
1422851_at	high mobility group AT-hook 2	Hmga2	5,06
1424484_at	MOB1, Mps One Binder kinase activator-like 1B (yeast)	Mobk1b	5,53
1422471_at	peroxisomal biogenesis factor 13	Pex13	5,01
1425977_a_at	STE20-like kinase (yeast)	Slk	4,88
1419150_at	myogenic factor 6	Myf6	5,42
1418454_at	microfibrillar associated protein 5	Mfap5	5,52
1426571_at	transmembrane protein 16A	Tmem16a	5,35
1451416_a_at	transglutaminase 1, K polypeptide	Tgm1	4,83
1418480_at	chemokine (C-X-C motif) ligand 7	Cxcl7	4,70
1456341_a_at	Kruppel-like factor 9	Klf9	4,67

1430019_a_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	Hnrpa1	5,26
1416138_at	annexin A7	Anxa7	5,33
1437102_at	YTH domain family 1	Ythdf1	4,69
1452101_at	bleomycin hydrolase	Blmh	5,55
1450382_at	neurofibromatosis 2	Nf2	5,52
1451743_at	DNA segment, Chr 19, Wayne State University 162, expressed	D19Wsu162e	5,08
1452160_at	TCDD-inducible poly(ADP-ribose) polymerase	Tiparp	5,69
1453100_at	casein kinase II, alpha 2, polypeptide	Csnk2a2	5,36
1448218_s_at	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Ywhaz	5,65
1426221_at	loss of heterozygosity, 11, chromosomal region 2, gene A homolog (human)	Loh11cr2a	4,31
1427164_at	interleukin 13 receptor, alpha 1	Il13ra1	5,86
1437513_a_at	tumor differentially expressed 2	Tde2	5,52
1420503_at	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	Slc6a14	4,93
1438220_at	forkhead box J3	Foxj3	5,48
1448272_at	B-cell translocation gene 2, anti-proliferative	Btg2	5,22
1416774_at	wee 1 homolog (S. pombe)	Wee1	5,59
1417107_at	tumor protein D52-like 2	Tpd52l2	5,64
1419599_s_at	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 11	Ms4a11	4,81
1416881_at	myeloid cell leukemia sequence 1	Mcl1	5,88
1416062_at	TBC1 domain family, member 15	Tbc1d15	5,54
1422425_at	small proline-rich protein 2K	Sprr2k	4,77
1423187_at	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor-associated protein-like 2	Gabarapl2	5,43
1423040_at	basic leucine zipper and W2 domains 1	Bzw1	5,14
1423545_a_at	zinc finger protein 207	Zfp207	5,29
1426235_a_at	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthetase)	Glul	5,37
1423006_at	proviral integration site 1	Pim1	5,75
1449551_at	myosin IC	Myo1c	5,10
1420804_s_at	C-type lectin domain family 4, member d	Clec4d	5,51
1460486_at	RAB GTPase activating protein 1	Rabgap1	6,03
1425444_a_at	transforming growth factor, beta receptor II	Tgfbr2	5,11
1433428_x_at	transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	5,17
1460732_a_at	periplakin	Ppl	5,31
1427328_a_at	CLIP associating protein 2	Clasp2	5,29
1451596_a_at	sphingosine kinase 1	Sphk1	4,85
1425023_at	ubiquitin specific peptidase 3	Usp3	5,77
1427932_s_at	RIKEN cDNA 1200003I10 gene /// RIKEN cDNA 1200016E24 gene	1200003I10Rik	5,07
1435458_at	proviral integration site 1	Pim1	5,35
1452418_at	RIKEN cDNA 1200016E24 gene	1200016E24Rik	4,55
1418019_at	carboxypeptidase D	Cpd	6,03
1416664_at	cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	Cdc20	5,95
1421092_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 12	Serpina12	5,32

1421378_s_at	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	Abcc1	5,13
1422879_at	synaptophysin-like protein	Sypl	5,32
1419603_at	interferon activated gene 204 /// myeloid cell nuclear differentiation antigen	Ifi204 /// Mnda	5,50
1452207_at	Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain, 2	Cited2	4,98
1423461_a_at	ubiquitin-like 3	Ubl3	5,36
1424585_at	RAN binding protein 10	Ranbp10	4,99
1416237_at	epithelial V-like antigen 1	Eva1	5,38
1452066_a_at	Nedd4 family interacting protein 2	Ndfip2	5,85
1449851_at	period homolog 1 (Drosophila)	Per1	4,72
1448509_at	RIKEN cDNA 3110001A13 gene	3110001A13Rik	5,52
1432499_a_at	ubiquitination factor E4B, UFD2 homolog (S. cerevisiae)	Ube4b	5,75
1423345_at	degenerative spermatocyte homolog 1 (Drosophila)	Degs1	5,68
1424090_at	syndecan binding protein (syntenin) 2	Sdcbp2	4,97
1416926_at	transformation related protein 53 inducible nuclear protein 1	Trp53inp1	4,96
1427637_a_at	desmocollin 3	Dsc3	4,88
1418365_at	cathepsin H	Ctsh	5,39
1450676_at	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3	Tceb3	4,73
1453238_s_at	RIKEN cDNA E430024C06 gene	E430024C06Rik	5,13
1455869_at	Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, beta (Camk2b), mRNA	Camk2b	5,96
1418100_at	RIKEN cDNA A030009H04 gene	A030009H04Rik	4,74
1420772_a_at	TSC22 domain family 3	Tsc22d3	4,48
1450846_at	basic leucine zipper and W2 domains 1	Bzw1	5,22
1426009_a_at	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 beta	Pip5k1b	5,06
1417616_at	ST6 (alpha-N-acetyl-neuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2	St6galnac2	4,94
1424263_at	RIKEN cDNA 2810003C17 gene	2810003C17Rik	5,72
1427359_at	RIKEN cDNA A630082K20 gene	A630082K20Rik	5,80
1423992_at	GATA zinc finger domain containing 2A	Gatad2a	5,56
1428143_a_at	patatin-like phospholipase domain containing 2	Pnpla2	4,88
1424141_at	HECT domain containing 1	Hectd1	5,70
1451253_at	PX domain containing serine/threonine kinase	Pxk	5,44
1447926_at	ADP-ribosylation factor-like 5	Arl5	5,75
1434852_at	phospholipase A2, group IIF	Pla2g2f	5,64
1449424_at	pleckstrin 2	Plek2	5,11
1427348_at	zinc finger CCCH type containing 12A	Zc3h12a	5,48
1439017_x_at	adiponectin receptor 1	Adipor1	4,93
1449860_at	HIG1 domain family, member 1B	Higd1b	4,90
1425457_a_at	growth factor receptor bound protein 10	Grb10	5,51
1449237_at	arachidonate lipoxygenase 3	Aloxe3	4,89
1426679_at	zinc finger protein 706	Zfp706	4,96
1431645_a_at	guanosine diphosphate (GDP) dissociation inhibitor 2	Gdi2	5,25
1426155_a_at	odd-skipped related 2 (Drosophila)	Osr2	4,74
1418296_at	FXD domain-containing ion transport regulator 5	Fxd5	4,99

1438070_at	PHD finger protein 3	Phf3	5,45
1451680_at	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1	5,34
1425027_s_at	SFT2 domain containing 2	Sft2d2	4,81
1426875_s_at	sulfiredoxin 1 homolog (S. cerevisiae)	Srxn1	4,97
1448231_at	FK506 binding protein 5	Fkbp5	4,86
1449107_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 4	Nudt4	5,84
1419257_at	transcription elongation factor A (SII) 1	Tcea1	5,40
1416125_at	FK506 binding protein 5	Fkbp5	4,57
1416531_at	glutathione S-transferase omega 1	Gsto1	4,75
1416129_at	ERBB receptor feedback inhibitor 1	Errfi1	5,10
1415893_at	sphingosine phosphate lyase 1	Sgpl1	5,35
1455480_s_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	Ube2d3	6,03
1449367_at	three prime repair exonuclease 2	Trex2	4,94
1420931_at	mitogen activated protein kinase 8	Mapk8	5,37
1421116_a_at	reticulon 4	Rtn4	5,03
1431936_a_at	neuraminidase 2	Neu2	4,78
1429239_a_at	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 4	Stard4	5,95
1426004_a_at	transglutaminase 2, C polypeptide	Tgm2	5,05
1448364_at	cyclin G2	Ccng2	4,70
1455892_x_at	---	---	5,05
1417634_at	superoxide dismutase 3, extracellular	Sod3	5,45
1451006_at	xanthine dehydrogenase	Xdh	5,31
1416162_at	RAD21 homolog (S. pombe)	Rad21	5,30
1426666_a_at	unc-84 homolog A (C. elegans)	Unc84a	5,45
1426117_a_at	solute carrier family 19 (thiamine transporter), member 2	Slc19a2	5,85
1453988_a_at	insulin degrading enzyme	Ide	5,45
1419317_x_at	small proline rich-like 1	Sprrl1	4,68
1417611_at	transmembrane protein 37	Tmem37	6,01
1453943_a_at	acid phosphatase, prostate	Acpp	5,02
1425281_a_at	TSC22 domain family 3	Tsc22d3	5,42
1417566_at	abhydrolase domain containing 5	Abhd5	5,23
1426575_at	transmembrane protein 23	Tmem23	6,10
1425964_x_at	heat shock protein 1	Hspb1	5,51
1423734_at	RAS-related C3 botulinum substrate 1	Rac1	6,19
1448830_at	dual specificity phosphatase 1	Dusp1	5,13
1418413_at	caveolin 3	Cav3	4,81
1456380_x_at	calponin 3, acidic	Cnn3	5,66
1427789_s_at	GNAS (guanine nucleotide binding protein, alpha stimulating) complex locus	Gnas	4,93
1448936_at	syntaxin 12	Stx12	5,48
1450828_at	synaptopodin 2	Synpo2	5,67
1426175_a_at	tryptase alpha/beta 1	Tpsab1	5,00
1424389_at	nucleoporin like 1	Nupl1	5,44
1428346_at	TRAF type zinc finger domain containing 1	Trafd1	5,10

1452162_at	WD repeat domain 48	Wdr48	5,35
1418280_at	Kruppel-like factor 6	Klf6	5,95
1448471_a_at	cytotoxic T lymphocyte-associated protein 2 alpha	Ctla2a	5,64
1425810_a_at	cysteine and glycine-rich protein 1	Csrp1	5,54
1451927_a_at	mitogen activated protein kinase 14	Mapk14	5,87
1427391_a_at	procollagen, type XII, alpha 1	Col12a1	6,03
1421269_at	UDP-glucose ceramide glucosyltransferase	Ugcg	5,58
1427569_a_at	utrophin	Utrn	5,60
1435137_s_at	RIKEN cDNA 1200016E24 gene /// RIKEN cDNA A130040M12 gene	1200016E24Rik	5,01
1438133_a_at	cysteine rich protein 61	Cyr61	4,85
1416689_at	tuftelin 1	Tuft1	5,31
1421460_at	desmocollin 1	Dsc1	5,10
1450014_at	claudin 1	Cldn1	5,09
1452732_at	---	---	5,77
1415784_at	vacuolar protein sorting 35	Vps35	5,27
1448324_at	ribonucleic acid binding protein S1	Rnps1	5,18
1416592_at	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	Glrx1	5,77
1426532_at	zinc finger, MYND domain containing 11	Zmynd11	5,50
1422772_at	core 1 UDP-galactose:N-acetylgalactosamine-alpha-R beta 1,3-galactosyltransferase	C1galt1	5,46
1421694_a_at	chondroitin sulfate proteoglycan 2	Cspg2	5,60
1432436_a_at	adenylate kinase 3	Ak3	5,42
1449504_at	karyopherin (importin) alpha 1	Kpna1	5,78
1422863_s_at	PDZ and LIM domain 5	Pdlim5	5,40
1450977_s_at	N-myc downstream regulated gene 1 /// N-myc downstream regulated-like	Ndrg1 /// Ndrl	5,92
1450377_at	thrombospondin 1	Thbs1	5,07
1448581_at	zinc finger protein 346	Zfp346	5,55
1422570_at	YY1 transcription factor	Yy1	5,82
1422587_at	transmembrane protein 45a	Tmem45a	5,73
1425676_a_at	elongation of very long chain fatty acids (FEN1/Elo2, SUR4/Elo3, yeast)-like 1	Elov1	6,06
1451613_at	hornerin	Hrnr	5,31
1422736_at	RAN binding protein 9	Ranbp9	5,38
1425660_at	BTB (POZ) domain containing 3	Btbd3	5,85
1425658_at	CD109 antigen	Cd109	5,94
1434547_at	Carboxypeptidase D (Cpd), mRNA	Cpd	5,79
1419100_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade A, member 3N	Serpina3n	5,40
1425958_at	interleukin 1 family, member 9	Il1f9	5,76
1416244_a_at	cellular nucleic acid binding protein 1	Cnbp1	5,75
1452483_a_at	CD44 antigen	Cd44	5,12
1452315_at	kinesin family member 11	Kif11	5,35
1424786_s_at	WD repeat domain 45	Wdr45	5,12
1418020_s_at	carboxypeptidase D	Cpd	5,82
1427559_a_at	activating transcription factor 2	Atf2	5,35

1416704_at	mitogen activated protein kinase 14	Mapk14	6,07
1416593_at	glutaredoxin 1 (thioltransferase)	Glr1	5,69
1420771_at	small proline-rich protein 2D	Spr2d	5,44
1417237_at	phospholipase D2	Pld2	5,57
1432143_a_at	high mobility group box transcription factor 1	Hbp1	5,70
1422031_a_at	zinc finger, A20 domain containing 3	Za20d3	5,80
1423755_at	zinc finger, CCHC domain containing 8	Zcchc8	5,65
1416762_at	S100 calcium binding protein A10 (calpactin)	S100a10	5,66
1420461_at	macrophage stimulating 1 receptor (c-met-related tyrosine kinase)	Mst1r	5,87
1421370_a_at	interleukin 1 family, member 5 (delta)	Il1f5	5,87
1455479_a_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	Ube2d3	6,08
1427416_x_at	dual specificity phosphatase 7	Dusp7	6,05
1437314_a_at	DNA segment, Chr 8, ERATO Doi 812, expressed	D8Ert812e	5,78

Anexo 2. Genes con expresión disminuída en la piel del ratón $Rb^{ΔEpi};p21^{-/-}$

AFFY_ID	Nombre del gen	Símbolo del gen	Expresión
1416375_at	adaptor-related protein complex 3, mu 1 subunit	Ap3m1	0,17
1424460_s_at	cDNA sequence BC005662	BC005662	0,17
1448853_at	synaptojanin 2 binding protein	Synj2bp	0,17
1418395_at	RIKEN cDNA 1300013J15 gene	1300013J15Rik	0,18
1421001_a_at	carbonic anhydrase 6	Car6	0,19
1417430_at	cerebellar degeneration-related 2	Cdr2	0,18
1453321_at	fibronectin type III domain containing 1	Fndc1	0,18
1436416_x_at	fractured callus expressed transcript 1	Fxc1	0,18
1416765_s_at	mitochondria-associated protein involved in GM-CFS signal transduction	MGI:1913699	0,18
1450967_at	RIKEN cDNA 4933428I03 gene	4933428I03Rik	0,18
1418028_at	dopachrome tautomerase	Dct	0,19
1423680_at	fatty acid desaturase 1	Fads1	0,17
1439466_s_at	expressed sequence C77604	C77604	0,18
1417850_at	retinoblastoma 1	Rb1	0,17
1415788_at	ubiquitin-like domain containing CTD phosphatase 1	Ublcp1	0,17
1420842_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, F	Ptpfr	0,18
1417606_a_at	calreticulin	Calr	0,17
1460179_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily A, member 1	Dnaja1	0,17
1418327_at	RIKEN cDNA 1110058L19 gene	1110058L19Rik	0,18
1439453_x_at	RIKEN cDNA 1500026D16 gene	1500026D16Rik	0,17
1438652_x_at	phosphatidylinositol glycan, class Q	Pigq	0,17
1421025_at	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1	Agpat1	0,20
1438977_x_at	RAN, member RAS oncogene family	Ran	0,21
1437852_x_at	cleavage and polyadenylation specificity factor 3	Cpsf3	0,18
1452830_s_at	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase	Cad	0,20
1456314_x_at	CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)-associated protein 1	Cdk2ap1	0,20
1420452_at	keratin associated protein 5-2	Krtap5-2	0,20
1427035_at	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 14	Slc39a14	0,17
1437687_x_at	FK506 binding protein 9	Fkbp9	0,17
1452773_at	RIKEN cDNA 5730494N06 gene	5730494N06Rik	0,18
1417585_at	nucleoporin 210	Nup210	0,18
1417422_at	glycine N-methyltransferase	Gnmt	0,20
1424609_a_at	xanthine dehydrogenase /// cDNA sequence BC003993	Xdh	0,20
1424394_at	selenoprotein M	MGI:2149786	0,18
1417400_at	retinoic acid induced 14	Rai14	0,21
1452782_a_at	thioredoxin 2	Txn2	0,18
1435966_x_at	mitochondrial ribosomal protein L13	Mrpl13	0,18
1433532_a_at	myelin basic protein	Mbp	0,20
1452366_at	RIKEN cDNA 4732435N03 gene	4732435N03Rik	0,19
1421494_at	RIKEN cDNA 1110033F04 gene	1110033F04Rik	0,21
1451359_at	cDNA sequence BC005662	BC005662	0,20
1453207_at	hypothetical gene LOC554362	LOC554362	0,21
1418634_at	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	Notch1	0,17
1437164_x_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex	Atp5o	0,17
1433806_x_at	calreticulin	Calr	0,17
1438563_s_at	mitochondrial ribosomal protein S24	Mrps24	0,18
1421689_at	keratin associated protein 8-2	Krtap8-2	0,21
1416563_at	cytidine 5'-triphosphate synthase	Ctps	0,19
1424890_at	basonuclin 1	Bnc1	0,17
1448075_at	expressed sequence AA408251	AA408251	0,20
1454651_x_at	myelin basic protein	Mbp	0,19
1448698_at	cyclin D1	Ccnd1	0,20
1426965_at	RAS related protein 2a	Rap2a	0,17
1419707_at	keratin associated protein 14	Krtap14	0,23
1448808_a_at	expressed in non-metastatic cells 2, protein	Nme2	0,19
1434543_a_at	bola-like 2 (E. coli)	Bola2	0,17

1454060_a_at	neuroblastoma ras oncogene	Nras	0,18
1437767_s_at	fused toes	Fts	0,20
1420415_at	cDNA sequence AY026312	AY026312	0,22
1416910_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 15	Dnajc15	0,17
1422523_at	silver	Si	0,20
1416938_at	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 1	Chchd1	0,18
1438320_s_at	minichromosome maintenance deficient 7 (S. cerevisiae)	Mcm7	0,19
1450698_at	dual specificity phosphatase 2	Dusp2	0,19
1436791_at	wingless-related MMTV integration site 5A	Wnt5a	0,19
1448465_at	4-nitrophenylphosphatase domain	Nipsnap1	0,22
1438659_x_at	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6	Chchd6	0,19
1426511_at	sushi domain containing 2	Susd2	0,19
1451859_at	keratin associated protein 6-1	Krtap6-1	0,23
1448960_at	CXXC finger 5	Cxxc5	0,17
1422451_at	mitochondrial ribosomal protein S21	Mrps21	0,18
1428309_s_at	p53 and DNA damage regulated 1	Pdrg1	0,22
1437325_x_at	aldehyde dehydrogenase 18 family, member A1	Aldh18a1	0,17
1419872_at	colony stimulating factor 1 receptor	Csf1r	0,20
1452661_at	transferrin receptor	Tfrc	0,19
1454698_at	expressed sequence AW742319	AW742319	0,18
1425655_at	keratin associated protein 16-1	Krtap16-1	0,20
1438176_x_at	RIKEN cDNA 1110031B06 gene	1110031B06Rik	0,19
1454688_x_at	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	Tmed10	0,22
1417288_at	pleckstrin homology domain-containing, family A	Plekha2	0,21
1434291_a_at	small EDRK-rich factor 1	Serf1	0,18
1455904_at	growth arrest specific 5	Gas5	0,18
1417181_a_at	kinesin-associated protein 3	Kifap3	0,19
1415972_at	myristoylated alanine rich protein kinase C substrate	Marcks	0,20
1425872_at	keratin associated protein 6-1	Krtap6-1	0,23
1418440_at	procollagen, type VIII, alpha 1	Col8a1	0,23
1418884_x_at	tubulin, alpha 1	Tuba1	0,19
1418286_a_at	ephrin B1	Efnb1	0,19
1428847_a_at	microtubule-actin crosslinking factor 1	Macf1	0,22
1418049_at	latent transforming growth factor beta binding protein 3	Ltbp3	0,21
1418814_s_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	Ndufa12	0,21
1416476_a_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	Ube2d2	0,18
1417930_at	Ngfi-A binding protein 2	Nab2	0,17
1448288_at	nuclear factor I/B	Nfib	0,23
1426669_at	RIKEN cDNA C530044N13 gene	C530044N13Rik	0,18
1422479_at	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	Acss2	0,17
1433706_a_at	expressed sequence AW742319	AW742319	0,21
1438657_x_at	protein tyrosine phosphatase 4a1	Ptp4a1	0,21
1438159_x_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	Ndufv2	0,17
1417781_at	longevity assurance homolog 4 (S. cerevisiae)	Lass4	0,22
1422623_x_at	16 days embryo heart cDNA, RIKEN full-length enriched library	---	0,18
1420372_at	syntrophin, basic 2	Sntb2	0,19
1424780_a_at	DNA segment, Chr 10, University of California at Los Angeles 1	D10Ucla1	0,20
1448704_s_at	histocompatibility 47	H47	0,19
1419672_at	sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan 1	Spock1	0,18
1423828_at	fatty acid synthase	Fasn	0,18
1421680_at	RIKEN cDNA A030005L19 gene	A030005L19Rik	0,21
1427842_at	keratin associated protein 6-3	Krtap6-3	0,22
1450958_at	transmembrane 4 superfamily member 1	Tm4sf1	0,23
1455106_a_at	creatine kinase, brain	Ckb	0,21
1449154_at	procollagen, type XI, alpha 1	Col11a1	0,21
1456228_x_at	myelin basic protein	Mbp	0,24
1421594_a_at	synaptotagmin-like 2	Syt12	0,24
1425237_at	keratin associated protein 16-8	Krtap16-8	0,23

1428823_at	---	---	0,18
1417419_at	cyclin D1	Ccnd1	0,22
1424954_a_at	phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, type 1 gamma	Pip5k1c	0,18
1423181_s_at	chloride channel, nucleotide-sensitive, 1A	Clns1a	0,17
1419507_at	keratin associated protein 15	Krtap15	0,24
1417073_a_at	quaking	Qk	0,22
1417219_s_at	thymosin, beta 10	Tmsb10	0,19
1418209_a_at	profilin 2	Pfn2	0,21
1454738_x_at	peroxisomal biogenesis factor 6	Pex6	0,19
1456194_a_at	Parkinson disease (autosomal recessive, early onset) 7	Park7	0,16
1435112_a_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	Atp5h	0,19
1417417_a_at	cytochrome c oxidase, subunit VI a, polypeptide 1	Cox6a1	0,21
1433903_at	expressed sequence AU021838	AU021838	0,20
1454925_x_at	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Mdh1	0,19
1417420_at	cyclin D1	Ccnd1	0,20
1419564_at	zinc finger protein 467	Zfp467	0,20
1449575_a_at	glutathione S-transferase, pi 1	Gstp1	0,22
1456012_x_at	ribonuclease T2	Rnaset2	0,22
1433611_s_at	---	---	0,18
1425436_x_at	killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 3	Klra3	0,19
1439422_a_at	C1q domain containing 2	C1qdc2	0,19
1425431_at	keratin associated protein 16-10 /3/6	Krtap16-10/3/6	0,23
1456733_x_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade H, member 1	Serpinh1	0,17
1418236_s_at	autophagy-related 5 (yeast)	Atg5	0,24
1438211_s_at	D site albumin promoter binding protein	Dbp	0,18
1434484_at	RIKEN cDNA 1100001G20 gene	1100001G20Rik	0,19
1452169_a_at	diacylglycerol kinase zeta	Dgkz	0,20
1428554_a_at	RIKEN cDNA 1810035L17 gene	1810035L17Rik	0,21
1420829_a_at	tyrosine 3-monooxygenase	Ywhaq	0,18
1424659_at	slit homolog 2 (Drosophila)	Slit2	0,19
1451294_s_at	small nuclear ribonucleoprotein E	Snrpe	0,19
1455439_a_at	lectin, galactose binding, soluble 1	Lgals1	0,24
1422209_s_at	keratin associated protein 9-1	Krtap9-1	0,23
1434620_s_at	RIKEN cDNA 2610024E20 gene	2610024E20Rik	0,22
1449957_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, V	Ptpvr	0,20
1448229_s_at	cyclin D2	Ccnd2	0,22
1419127_at	neuropeptide Y	Npy	0,19
1427549_s_at	keratin associated protein 16-10/3/6	Krtap16-10/3/6	0,24
1424208_at	prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)	Ptger4	0,20
1426833_at	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 3	Eif4g3	0,20
1449559_at	homeo box, msh-like 2	Msx2	0,23
1429270_a_at	synaptonemal complex central element protein 2	Syce2	0,23
1426203_at	keratin associated protein 16-4	Krtap16-4	0,23
1422298_at	RIKEN cDNA 5530401N06 gene	5530401N06Rik	0,22
1423285_at	coagulation factor C homolog (Limulus polyphemus)	Coch	0,20
1438312_s_at	latent transforming growth factor beta binding protein 3	Ltbp3	0,23
1416024_x_at	chaperonin subunit 3 (gamma)	Cct3	0,17
1437843_s_at	Nucleoporin like 1 (Nupl1), mRNA	Nupl1	0,19
1415964_at	stearoyl-Coenzyme A desaturase 1	Scd1	0,23
1417717_a_at	tyrosinase	Tyr	0,24
1427365_at	keratin complex 2, basic, gene 10	Krt2-10	0,23
1426893_at	RIKEN cDNA C230093N12 gene	C230093N12Rik	0,18
1427366_at	keratin associated protein 3-1	Krtap3-1	0,21
1434420_x_at	translocase of outer mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	Tomm22	0,20
1432435_s_at	RIKEN cDNA C030004A17 gene	C030004A17Rik	0,17
1417803_at	RIKEN cDNA 1110032A04 gene	1110032A04Rik	0,20
1424204_at	mitochondrial ribosomal protein L13	Mrpl13	0,22
1419188_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 27	Ccl27	0,22

1428585_at	actinin, alpha 1	Actn1	0,21
1436689_a_at	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1	Aldh9a1	0,22
1455956_x_at	cyclin D2	Ccnd2	0,22
1422443_at	X-prolyl aminopeptidase (aminopeptidase P) 1, soluble	Xpnpep1	0,23
1452731_x_at	similar to hypothetical protein LOC67055	LOC544986	0,20
1435613_x_at	cytochrome c oxidase, subunit Vb	Cox5b	0,21
1452734_at	ribonuclease T2	Rnaset2	0,23
1451000_at	RIKEN cDNA 1810020E01 gene	1810020E01Rik	0,22
1423852_at	transmembrane protein 46	Tmem46	0,20
1459926_at	expressed sequence C77068	C77068	0,21
1424026_s_at	cDNA sequence BC013529	BC013529	0,17
1437999_x_at	phosphatidylinositol glycan, class Q	Pigq	0,21
1428301_at	similar to hypothetical protein LOC67055	LOC544986	0,19
1418579_at	centrin 2	Cetn2	0,17
1425747_at	dedicator of cytokinesis 5	Dock5	0,19
1415810_at	ubiquitin-like, containing PHD and RING finger domains, 1	Uhrf1	0,25
1420538_at	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member D	Gprc5d	0,24
1455319_x_at	ribosomal protein S8	Rps8	0,18
1436153_a_at	zinc finger, MYND domain containing 11	Zmynd11	0,23
1428572_at	brain abundant, membrane attached signal protein 1	Basp1	0,22
1447919_x_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, alpha/beta subcomplex, 1	Ndufab1	0,20
1425430_at	keratin associated protein 16-5	Krtap16-5	0,22
1448237_x_at	lactate dehydrogenase 2, B chain	Ldh2	0,19
1418106_at	hairly/enhancer-of-split related with YRPW motif 2	Hey2	0,20
1441659_at	D4, zinc and double PHD fingers, family 3	Dpf3	0,20
1418935_at	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Trpm1	0,24
1427280_at	sodium channel, voltage-gated, type II, alpha 1	Scn2a1	0,20
1421589_at	keratin complex 1, acidic, gene 1	Krt1-1	0,25
1420751_at	keratin associated protein 6-1	Krtap6-1	0,25
1416698_a_at	CDC28 protein kinase 1b	Cks1b	0,19
1423757_x_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,21
1420409_at	keratin complex 1, acidic, gene 24	Krt1-24	0,26
1438650_x_at	gap junction membrane channel protein alpha 1	Gja1	0,18
1417580_s_at	selenium binding protein 1	Selenbp1	0,19
1419913_at	Serine/threonine kinase receptor associated protein (Strap)	Strap	0,18
1451254_at	inhibitor of kappa light polypeptide enhancer in B-cells	Ikbkap	0,19
1450825_at	N-acylsphingosine amidohydrolase (alkaline ceramidase) 3	Asah3	0,19
1415766_at	RIKEN cDNA 4930564D15 gene	4930564D15Rik	0,19
1428007_at	keratin associated protein 13-1	Krtap13-1	0,26
1419646_a_at	myelin basic protein	Mbp	0,23
1432164_a_at	glycine cleavage system protein H (aminomethyl carrier)	Gcsh	0,19
1456109_a_at	mitochondrial ribosomal protein S15	Mrps15	0,19
1416824_at	RIKEN cDNA B230118H07 gene	B230118H07Rik	0,17
1455855_x_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	Hnrpab	0,22
1448956_at	START domain containing 10	Stard10	0,22
1436803_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 9	Ndufb9	0,21
1416177_at	RNA binding motif protein, X chromosome retrogene	Rbmxt	0,19
1424638_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Cdkn1a	0,24
1416151_at	splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SRP20)	Sfrs3	0,17
1421088_at	glypican 4	Gpc4	0,18
1435110_at	unc-5 homolog B (C. elegans)	Unc5b	0,25
1421691_at	keratin associated protein 16-7	Krtap16-7	0,24
1420830_x_at	tyrosine 3-monooxygenase	Ywhaq	0,18
1417433_at	lysophospholipase 2	Lypla2	0,22
1415861_at	tyrosinase-related protein 1	Typr1	0,24
1426615_s_at	N-myc downstream regulated gene 4	Ndrp4	0,19
1434745_at	cyclin D2	Ccnd2	0,23
1449122_at	RIKEN cDNA 3110003A22 gene	3110003A22Rik	0,26

1426760_at	importin 8	Ipo8	0,22
1423456_at	basic leucine zipper and W2 domains 2	Bzw2	0,23
1452692_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2	Ndufv2	0,19
1417160_s_at	extracellular proteinase inhibitor	Expi	0,19
1451623_at	mitochondrial ribosomal protein L15	Mrpl15	0,19
1452405_x_at	T-cell receptor alpha chain /// RIKEN cDNA A430107P09 gene	Tcra	0,19
1444952_a_at	nuclear casein kinase and cyclin-dependent kinase substrate 1	Nucks1	0,21
1437993_x_at	quininoid dihydropteridine reductase	Qdpr	0,18
1433952_at	---	---	0,18
1424033_at	splicing factor, arginine/serine-rich 7	Sfrs7	0,23
1417404_at	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	Elovl6	0,25
1451753_at	plexin A2	Plxna2	0,24
1449387_at	RIKEN cDNA 2310015J09 gene	2310015J09Rik	0,25
1417339_a_at	dynein, cytoplasmic, light chain 1	Dncl1	0,21
1426060_at	Cullin 4A (Cul4a), mRNA	Cul4a	0,22
1449287_at	src-related kinase lacking C-terminal regulatory tyrosine	Srms	0,19
1436362_x_at	CCR4 carbon catabolite repression 4-like (S. cerevisiae)	Ccrn4l	0,23
1455824_x_at	integral membrane protein 1	Iltm1	0,19
1453461_at	fractured callus expressed transcript 1	Fxc1	0,22
1450645_at	metallothionein 4	Mt4	0,25
1416971_at	cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2	Cox7a2	0,21
1416567_s_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex	Atp5e	0,20
1451649_a_at	WD repeat domain 75	Wdr75	0,20
1422478_a_at	acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	Acss2	0,21
1428340_s_at	ATPase type 13A2	Atp13a2	0,18
1416056_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 11	Ndufb11	0,20
1449560_at	RIKEN cDNA 2310043L02 gene	2310043L02Rik	0,26
1448685_at	RIKEN cDNA 2900010M23 gene	2900010M23Rik	0,17
1419327_at	expressed sequence AA415817	AA415817	0,20
1432282_a_at	RIKEN cDNA 2010305C02 gene	2010305C02Rik	0,24
1418587_at	Tnf receptor-associated factor 3	Traf3	0,20
1449632_s_at	FK506 binding protein 10	Fkbp10	0,19
1420581_at	G protein-coupled receptor 143	Gpr143	0,22
1452957_at	keratin associated protein 3-3	Krtap3-3	0,22
1426408_at	CUG triplet repeat, RNA binding protein 1	Cugbp1	0,23
1416064_a_at	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)	Hspa5	0,20
1419732_at	reticulon 4 receptor	Rtn4r	0,24
1416189_a_at	Sec61 alpha 1 subunit (S. cerevisiae)	Sec61a1	0,21
1451382_at	RIKEN cDNA 1810008K03 gene	1810008K03Rik	0,26
1437341_x_at	cyclic nucleotide phosphodiesterase 1	Cnp1	0,18
1456170_x_at	calreticulin	Calr	0,18
1428097_at	RIKEN cDNA 2510009E07 gene	2510009E07Rik	0,24
1448904_at	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 176, expressed	D6Wsu176e	0,19
1437380_x_at	phosphogluconate dehydrogenase	Pgd	0,21
1420599_at	RIKEN cDNA 2300006N05 gene	2300006N05Rik	0,25
1456028_x_at	Myristoylated alanine rich protein kinase C substrate (Marcks), mRNA	Marcks	0,24
1423833_a_at	brain protein 44	Brp44	0,21
1438649_x_at	phosphatidylethanolamine binding protein	Pbp	0,24
1434943_at	cDNA sequence BC023055	BC023055	0,17
1427078_at	sorting nexin 19	Snx19	0,21
1417910_at	cyclin A2	Ccna2	0,23
1423960_at	gene rich cluster, C3f gene	Grcc3f	0,19
1418752_at	aldehyde dehydrogenase family 3, subfamily A1	Aldh3a1	0,25
1427049_s_at	smoothened homolog (Drosophila)	Smo	0,21
1426677_at	filamin, alpha	Flna	0,22
1451774_at	similar to keratin associated protein 4-10; keratin	LOC435285	0,24

	associated protein 4.10		
1437685_x_at	fibromodulin	Fmod	0,23
1416544_at	enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)	Ezh2	0,19
1437389_x_at	---	---	0,19
1454813_at	RIKEN cDNA 1110017022 gene	1110017022Rik	0,23
1418986_a_at	ubiquitously expressed transcript	Uxt	0,20
1424205_at	SWI/SNF, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin	Smarca5	0,18
1417780_at	longevity assurance homolog 4 (S. cerevisiae)	Lass4	0,25
1420467_at	psoriasis susceptibility 1 candidate 2 (human)	Psors1c2	0,26
1421087_at	period homolog 3 (Drosophila)	Per3	0,22
1424694_at	RIKEN cDNA 2010011120 gene	2010011120Rik	0,25
1438938_x_at	prohibitin 2	Phb2	0,23
1434019_at	PDGFA associated protein 1	Pdap1	0,23
1448295_at	DNA segment, Chr 13, Wayne State University 50, expressed	D13Wsu50e	0,18
1418101_a_at	reticulon 3	Rtn3	0,26
1423050_s_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	Hnrpu	0,21
1454714_x_at	3-phosphoglycerate dehydrogenase	Phgdh	0,21
1419645_at	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA subunit 2	Cstf2	0,19
1424886_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	Ptprd	0,20
1433443_a_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	Hmgcs1	0,24
1416118_at	---	---	0,20
1452769_at	RIKEN cDNA 3732413111 gene	3732413111Rik	0,18
1424556_at	pyrroline-5-carboxylate reductase 1	Pycr1	0,18
1430713_s_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 13	Ndufa13	0,23
1433408_a_at	minichromosome maintenance deficient 10 (S. cerevisiae)	Mcm10	0,19
1456340_at	---	---	0,22
1438943_x_at	ribophorin I	Rpn1	0,20
1435602_at	Selenophosphate synthetase 2 (Seps2), mRNA	Seps2	0,23
1427729_at	EH-domain containing 2	Ehd2	0,18
1452829_at	carbamoyl-phosphate synthetase 2, aspartate transcarbamylase	Cad	0,20
1421099_at	basic helix-loop-helix domain containing, class B3	Bhlhb3	0,25
1429352_at	molybdenum cofactor sulfurase	Mocos	0,24
1416355_at	RNA binding motif protein, X chromosome	RbmX	0,19
1416489_at	phosphatidylinositol 4-kinase type 2 beta	Pi4k2b	0,18
1419767_at	peptidyl arginine deiminase, type III	Padi3	0,24
1415772_at	nucleolin	Ncl	0,20
1427981_a_at	cysteine sulfinic acid decarboxylase	Csad	0,17
1427331_at	adenosine A1 receptor	Adora1	0,20
1437902_s_at	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	Rarres2	0,23
1434499_a_at	lactate dehydrogenase 2, B chain	Ldh2	0,20
1423099_a_at	methyltransferase-like 3	Mettl3	0,21
1455939_x_at	signal recognition particle 14	Srp14	0,18
1421996_at	transcription factor AP-2, alpha	Tcfap2a	0,19
1455806_x_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	Ndufa12	0,21
1423676_at	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit d	Atp5h	0,19
1417979_at	tenomodulin	Tnmd	0,23
1455058_at	myotubularin related protein 9	Mttr9	0,20
1421807_at	defensin beta 6	Defb6	0,25
1439959_at	fibroblast growth factor 11	Fgf11	0,21
1422818_at	neural precursor cell expressed	Nedd9	0,22
1422241_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 1	Ndufa1	0,21
1427179_at	keratin complex 1, acidic, gene 3	Krt1-3	0,23
1451435_at	cut-like 1 (Drosophila)	Cutl1	0,26
1417538_at	solute carrier family 35 (CMP-sialic acid transporter), member 1	Slc35a1	0,17
1428538_s_at	retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 2	Rarres2	0,22
1426573_at	malic enzyme 2, NAD(+)-dependent, mitochondrial	Me2	0,17

1422555_s_at	guanine nucleotide binding protein, alpha 13	Gna13	0,25
1440195_at	Serpine1 mRNA binding protein 1	Serbp1	0,19
1426876_at	RIKEN cDNA 4732466D17 gene	4732466D17Rik	0,18
1420573_at	homeo box D1	Hoxd1	0,21
1423756_s_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,19
1449813_at	zinc finger protein 30	Zfp30	0,17
1424607_a_at	xanthine dehydrogenase /// cDNA sequence BC003993	Xdh	0,21
1416970_a_at	cytochrome c oxidase, subunit VIIa 2	Cox7a2	0,22
1425874_at	homeo box C13	Hoxc13	0,19
1455972_x_at	L-3-hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, short chain	Hadhsc	0,23
1436030_at	cache domain containing 1	Cachd1	0,20
1419273_at	expressed sequence C80913	C80913	0,23
1423253_at	myelin protein zero	Mpz	0,26
1439373_x_at	wingless-related MMTV integration site 5B	Wnt5b	0,18
1419918_at	transmembrane emp24 protein transport domain containing 7	Tmed7	0,20
1437670_x_at	CD151 antigen	Cd151	0,25
1415695_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type 1	Psma1	0,23
1428314_at	PEST-containing nuclear protein	Pcnp	0,20
1428580_at	biliverdin reductase A	Blvra	0,20
1416954_at	solute carrier family 25	Slc25a10	0,23
1419371_s_at	golgi SNAP receptor complex member 2	Gosr2	0,18
1424674_at	solute carrier family 39 (metal ion transporter), member 6	Slc39a6	0,25
1418374_at	FXD domain-containing ion transport regulator 3	Fxyd3	0,18
1428075_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex 4	Ndubf4	0,20
1430509_at	RIKEN cDNA 2310040M23 gene	2310040M23Rik	0,23
1437133_x_at	aldo-keto reductase family 1, member B3 (aldose reductase)	Akr1b3	0,23
1417952_at	cytochrome P450, family 2, subfamily j, polypeptide 6	Cyp2j6	0,25
1417560_at	sideroflexin 1	Sfxn1	0,21
1456095_at	Tyrosinase (Tyr), mRNA	Tyr	0,19
1434628_a_at	rhophilin, Rho GTPase binding protein 2	Rhpn2	0,20
1449565_at	cytochrome P450, family 2, subfamily g, polypeptide 1	Cyp2g1	0,27
1433645_at	RIKEN cDNA 2210409B22 gene	2210409B22Rik	0,19
1453836_a_at	monoglyceride lipase	Mgl1	0,29
1426013_s_at	pleckstrin homology domain containing, family A	Plekha4	0,18
1449490_at	methyl-CpG binding domain protein 4	Mbd4	0,23
1454674_at	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	Fez1	0,21
1422944_a_at	diaphanous homolog 3 (Drosophila)	Diap3	0,21
1419840_at	expressed sequence AI507495	AI507495	0,28
1449963_at	RIKEN cDNA 2310040M23 gene	2310040M23Rik	0,23
1450475_at	distal-less homeobox 3	Dlx3	0,24
1438368_a_at	matrin 3	Matr3	0,25
1449861_at	NIMA (never in mitosis gene a)-related expressed kinase 4	Nek4	0,21
1436898_at	splicing factor proline/glutamine rich	Sfpq	0,21
1423976_at	RIKEN cDNA 4930453N24 gene	4930453N24Rik	0,27
1438948_x_at	benzodiazepine receptor, peripheral	Bzrp	0,24
1418742_at	keratin complex 1, acidic, gene 4	Krt1-4	0,26
1449340_at	sclerostin domain containing 1	Sostdc1	0,20
1455283_x_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	Ndufs8	0,27
1452114_s_at	insulin-like growth factor binding protein 5	Igfbp5	0,22
1450536_s_at	keratin associated protein 12-1	Krtap12-1	0,20
1450503_at	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 2	Kcnj2	0,25
1417081_a_at	synaptogyrin 2	Syng2	0,20
1448700_at	G0/G1 switch gene 2	G0s2	0,25
1450391_a_at	monoglyceride lipase	Mgl1	0,27
1456107_x_at	elongation factor Tu GTP binding domain containing 2	Eftud2	0,20
1428835_at	myosin, heavy polypeptide 14	Myh14	0,23
1449919_at	keratin associated protein 6-2	Krtap6-2	0,24
1454872_at	RIKEN cDNA B230308N11 gene	B230308N11Rik	0,20

1426323_x_at	Cd27 binding protein (Hindu God of destruction)	MGI:1353606	0,19
1426805_at	SWI/SNF related, matrix associated	Smarca4	0,24
1450774_at	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6D	Ly6g6d	0,25
1449378_at	keratin complex-1, acidic, gene C29	Krt1-c29	0,27
1427118_at	keratin complex 2, basic, gene 10	Krt2-10	0,25
1438422_at	leucine rich repeat containing 20	Lrrc20	0,26
1438430_at	High mobility group box transcription factor 1 (Hbp1)	Hbp1	0,25
1456588_x_at	cytochrome c oxidase, subunit Vb	Cox5b	0,27
1456003_a_at	solute carrier family 1 (glutamate	Slc1a4	0,21
1424663_at	cDNA sequence BC017647	BC017647	0,18
1426528_at	neuropilin 2	Nrp2	0,19
1449546_a_at	zinc finger protein 617	Zfp617	0,23
1460702_at	RIKEN cDNA 1810015M01 gene	1810015M01Rik	0,20
1437867_at	PREDICTED: similar to protease [Mus musculus], mRNA sequence	---	0,22
1426513_at	RNA binding motif protein 28	Rbm28	0,20
1451083_s_at	alanyl-tRNA synthetase	Aars	0,21
1448284_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1	Ndufc1	0,21
1438152_at	GPI anchor attachment protein 1, Mrna	Gpaa1	0,21
1455036_s_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2	Ndufc2	0,19
1438001_x_at	deleted in polyposis 1	Dp1	0,21
1424877_a_at	aminolevulinate, delta-, dehydratase	Alad	0,27
1460701_a_at	mitochondrial ribosomal protein L52	Mrpl52	0,24
1434425_at	expressed sequence AI597080	AI597080	0,28
1436887_x_at	glutamate-rich WD repeat containing 1	Grwd1	0,19
1454941_at	N-myristoyltransferase 1	Nmt1	0,20
1420399_at	growth factor independent 1B	Gfi1b	0,22
1435509_x_at	CDK2 (cyclin-dependent kinase 2)-associated protein 1	Cdk2ap1	0,20
1426960_a_at	fatty acid 2-hydroxylase	Fa2h	0,24
1426778_at	dystroglycan 1	Dag1	0,21
1416281_at	Wdr45 like	Wdr45l	0,24
1423202_a_at	nuclear receptor co-repressor 1	Ncor1	0,19
1415986_at	chloride channel 4-2	Clcn4-2	0,20
1455815_a_at	tyrosine 3-monooxygenase	Ywhab	0,23
1456251_x_at	benzodiazepine receptor, peripheral	Bzrp	0,28
1435315_s_at	RIKEN cDNA 2900034E22 gene	2900034E22Rik	0,19
1452198_at	F-box and leucine-rich repeat protein 10	Fbxl10	0,21
1417505_s_at	interleukin 11 receptor, alpha chain 1	Il11ra1-2	0,17
1438143_s_at	---	---	0,21
1416439_at	RIKEN cDNA 2410015N17 gene	2410015N17Rik	0,21
1415761_at	mitochondrial ribosomal protein L52	Mrpl52	0,21
1421091_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor	Serpina12	0,17
1451055_at	solute carrier family 45, member 2	Slc45a2	0,23
1424746_at	---	---	0,27
1418715_at	pantothenate kinase 1	Pank1	0,21
1450650_at	myosin X	Myo10	0,25
1416795_at	crystallin, lamda 1	Cryl1	0,20
1424730_a_at	solute carrier family 15 (H+/peptide transporter), member 2	Slc15a2	0,18
1421679_a_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)	Cdkn1a	0,28
1435527_at	RIKEN cDNA 1500041O16 gene	1500041O16Rik	0,17
1435056_x_at	protein O-fucosyltransferase 2	Pofut2	0,21
1431145_a_at	CUE domain containing 2	Cuedc2	0,19
1428322_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 10	Ndufb10	0,23
1419738_a_at	tropomyosin 2, beta	Tpm2	0,25
1422432_at	diazepam binding inhibitor	Dbi	0,24
1456205_x_at	tubulin cofactor a	Tbca	0,22
1420728_at	keratin complex 1, acidic, gene 2	Krt1-2	0,27
1420171_s_at	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	Myh9	0,24

1420489_at	mitochondrial ribosomal protein S14	Mrps14	0,24
1455880_s_at	beclin 1 (coiled-coil, myosin-like BCL2-interacting protein)	Becn1	0,25
1451111_at	nucleoporin 133	Nup133	0,20
1424729_at	cDNA sequence BC054059	BC054059	0,26
1449091_at	claudin 8	Cldn8	0,20
1449945_at	peroxisome proliferative activated receptor, gamma, coactivator 1 beta	Ppargc1b	0,18
1448517_at	translocase of inner mitochondrial membrane 22 homolog (yeast)	Timm22	0,29
1436180_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 5	Dnajc5	0,24
1417089_a_at	creatine kinase, mitochondrial 1, ubiquitous	Ckmt1	0,18
1435551_at	formin-family protein FHOS2	FHOS2	0,21
1454822_x_at	adenomatosis polyposis coli down-regulated 1	Apcdd1	0,18
1418015_at	pumilio 2 (Drosophila)	Pum2	0,22
1425129_a_at	transaldolase 1	Taldo1	0,25
1455804_x_at	3-oxoacid CoA transferase 1	Oxct1	0,19
1435734_x_at	dihydrouridine synthase 1-like (S. cerevisiae)	Dus1l	0,23
1427211_at	keratin associated protein 8-1	Krtap8-1	0,28
1422670_at	Rho family GTPase 2	Rnd2	0,19
1416514_a_at	fascin homolog 1, actin bundling protein	Fscn1	0,21
1451750_at	interleukin-1 receptor-associated kinase 4	Irak4	0,22
1417351_a_at	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	Snrpa1	0,22
1456600_a_at	ring finger protein 7	Rnf7	0,20
1426347_at	RIKEN cDNA 2010321M09 gene	2010321M09Rik	0,24
1433513_x_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 12	Ndufa12	0,23
1420611_at	protein kinase, cAMP dependent, catalytic, beta	Prkacb	0,23
1449475_at	ATPase, H ⁺ /K ⁺ transporting, nongastric, alpha polypeptide	Atp12a	0,25
1416902_a_at	cytochrome c oxidase, subunit Vb	Cox5b	0,25
1423859_a_at	prostaglandin D2 synthase (brain)	Ptgds	0,28
1450943_at	RIKEN cDNA 2010012C16 gene	2010012C16Rik	0,18
1455741_a_at	endothelin converting enzyme 1	Ece1	0,20
1416122_at	cyclin D2	Ccnd2	0,24
1417953_at	DNA segment, Chr 6, Wayne State University 176, expressed	D6Wsu176e	0,22
1434367_s_at	nuclear transport factor 2	Nutf2	0,22
1422518_at	calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (MAGUK family)	Cask	0,19
1424964_at	retinitis pigmentosa 1 homolog (human)	Rp1h	0,26
1437043_a_at	RIKEN cDNA 1110012M11 gene	1110012M11Rik	0,22
1424313_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7	Ndufs7	0,17
1427144_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like	Hnrpll	0,17
1418535_at	ral guanine nucleotide dissociation stimulator, -like 1	Rgl1	0,18
1451641_at	debranching enzyme homolog 1 (S. cerevisiae)	Dbr1	0,19
1418072_at	histone 1, H2bc	Hist1h2bc	0,20
1450535_at	keratin associated protein 12-1	Krtap12-1	0,25
1431028_a_at	pantothenate kinase 1	Pank1	0,20
1438050_x_at	---	---	0,25
1428244_at	La ribonucleoprotein domain family, member 1	Larp1	0,19
1423489_at	monocyte to macrophage differentiation-associated	Mmd	0,29
1449412_at	RIKEN cDNA 1810046J19 gene	1810046J19Rik	0,26
1416776_at	crystallin, mu	Crym	0,28
1416470_a_at	ribophorin I	Rpn1	0,20
1451360_at	RIKEN cDNA 1200009B18 gene	1200009B18Rik	0,23
1430127_a_at	cyclin D2	Ccnd2	0,25
1435395_s_at	ATP synthase, H ⁺ transporting	Atp5j2	0,25
1431653_at	similar to T-cell receptor beta chain V region 86T1 precursor	LOC330294	0,21
1419270_a_at	deoxyuridine triphosphatase	Dut	0,23
1427913_at	RWD domain containing 1	Rwdd1	0,19
1425595_at	gamma-aminobutyric acid (GABA-B) receptor, 1	Gabbr1	0,30
1453571_at	DEP domain containing 6	Depdc6	0,23

1429054_at	mitochondrial ribosomal protein L47	Mrpl47	0,23
1434900_at	MKL (megakaryoblastic leukemia)/myocardin-like 1	Mkl1	0,18
1449757_x_at	deoxynucleotidyltransferase, terminal	Dntt	0,23
1426910_at	PRKC, apoptosis, WT1, regulator	Pawr	0,21
1438154_x_at	hypothetical protein LOC67513	2610002J02Rik	0,23
1427248_at	Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 2 (human)	Whsc2	0,28
1437711_x_at	ornithine decarboxylase, structural 1	Odc1	0,19
1451356_at	acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, member E	Anp32e	0,25
1448347_a_at	GPI-anchored membrane protein 1	Gpiap1	0,22
1450988_at	leucine rich repeat containing G protein coupled receptor 5	Lgr5	0,28
1427196_at	WNK lysine deficient protein kinase 4	Wnk4	0,22
1449040_a_at	selenophosphate synthetase 2	Sephs2	0,29
1425942_a_at	glycoprotein m6b	Gpm6b	0,19
1452443_s_at	helicase with zinc finger domain	Helz	0,19
1448124_at	glucuronidase, beta	Gusb	0,19
1427898_at	ring finger protein (C3H2C3 type) 6	Rnf6	0,21
1423284_at	MANSC domain containing 1	Mansc1	0,23
1419339_at	neuraminidase 3	Neu3	0,19
1438155_x_at	phosphatidylinositol glycan, class O	Pigo	0,23
1451559_a_at	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 4	Dhrs4	0,23
1420365_a_at	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	Hnrpa2b1	0,21
1423896_a_at	ring finger protein 187	Rnf187	0,23
1420193_at	keratin complex 1, acidic, gene 17	Krt1-17	0,21
1424296_at	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Gclc	0,28
1420709_s_at	D-amino acid oxidase 1	Dao1	0,21
1424214_at	RIKEN cDNA 9130213B05 gene	9130213B05Rik	0,18
1433627_at	Sec23 interacting protein	Sec23ip	0,28
1416632_at	malic enzyme, supernatant	Mod1	0,27
1416422_a_at	Sjogren syndrome antigen B	Ssb	0,25
1420722_at	elongation of very long chain fatty acids	Elovl3	0,30
1431117_x_at	RIKEN cDNA 1810029B16 gene	1810029B16Rik	0,20
1420388_at	protease, serine, 12 neurotrypsin (motopsin)	Prss12	0,23
1416868_at	cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)	Cdkn2c	0,30
1428453_at	RIKEN cDNA 4930487N19 gene	4930487N19Rik	0,19
1422849_a_at	poly(A) binding protein, nuclear 1	Pabpn1	0,22
1438886_at	hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif-like	Heyl	0,21
1416946_a_at	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	Acaa1	0,19
1418173_at	RIKEN cDNA 4631426H08 gene	4631426H08Rik	0,30
1436810_x_at	RIKEN cDNA 2900010M23 gene	2900010M23Rik	0,19
1422760_at	peptidyl arginine deiminase, type IV	Padi4	0,22
1448318_at	adipose differentiation related protein	Adfp	0,26
1448789_at	aldehyde dehydrogenase family 1, subfamily A3	Aldh1a3	0,25
1419706_a_at	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	Akap12	0,18
1438647_x_at	centrin 2	Cetn2	0,21
1455214_at	microphthalmia-associated transcription factor	Mitf	0,27
1417763_at	signal sequence receptor, alpha	Ssr1	0,20
1417368_s_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 2	Ndufa2	0,24
1449438_at	dolichol-phosphate (beta-D) mannosyltransferase 1	Dpm1	0,20
1424000_a_at	ribosomal protein S11	Rps11	0,22
1434243_s_at	---	---	0,23
1437379_x_at	TNF receptor-associated protein 1, mRNA	Trap1	0,25
1418205_at	thrombospondin, type I, domain 1	Thsd1	0,24
1422467_at	---	---	0,25
1415917_at	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent)	Mthfd1	0,18
1424721_at	microfibrillar-associated protein 3	Mfap3	0,21
1455211_a_at	translocase of inner mitochondrial membrane 13 homolog	Timm13	0,18
1423711_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex	Ndufaf1	0,23
1417331_a_at	ADP-ribosylation factor-like 6	Arl6	0,26

1455959_s_at	glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit	Gclc	0,29
1427145_at	IQ motif and Sec7 domain 1	lqsec1	0,19
1436351_at	coenzyme Q3 homolog, methyltransferase (yeast)	Coq3	0,21
1433516_a_at	similar to multiple myeloma overexpression gene 2	---	0,19
1423500_a_at	SRY-box containing gene 5	Sox5	0,29
1450773_at	potassium voltage-gated channel, Shal-related family	Kcnd2	0,25
1450191_a_at	SRY-box containing gene 13	Sox13	0,19
1452433_at	---	---	0,28
1418773_at	fatty acid desaturase 3	Fads3	0,28
1418176_at	vitamin D receptor	Vdr	0,23
1429321_at	---	---	0,22
1428351_at	protein phosphatase 1M	Ppm1m	0,29
1436201_x_at	myelin basic protein	Mbp	0,22
1435018_at	RIKEN cDNA 5930434B04 gene	5930434B04Rik	0,26
1455235_x_at	lactate dehydrogenase 2, B chain	Ldh2	0,21
1427801_at	keratin associated protein 16-2	Krtap16-2	0,23
1435630_s_at	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 2	Acat2	0,26
1417695_a_at	sterol O-acyltransferase 1	Soat1	0,20
1423753_at	BMP and activin membrane-bound inhibitor, homolog	Bambi	0,26
1448463_at	RIKEN cDNA 4933434E20 gene	4933434E20Rik	0,25
1436949_a_at	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 2	Tceb2	0,25
1437336_x_at	RIKEN cDNA 1110002E23 gene	1110002E23Rik	0,24
1448610_a_at	superoxide dismutase 2, mitochondrial	Sod2	0,22
1419545_a_at	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit C, isoform 1	Atp6v1c1	0,24
1425611_a_at	cut-like 1 (Drosophila)	Cutl1	0,28
1421262_at	lipase, endothelial	Lipg	0,19
1449799_s_at	plakophilin 2	Pkp2	0,22
1421856_at	S100 calcium binding protein A3	S100a3	0,30
1427342_at	RIKEN cDNA 5330408N05 gene	5330408N05Rik	0,20
1422337_at	olfactory receptor 156	Olfr156	0,24
1439409_x_at	tyrosinase-related protein 1	Typr1	0,28
1456125_a_at	dynein, cytoplasmic, light chain 1	Dncl1	0,26
1450070_s_at	p21 (CDKN1A)-activated kinase 1	Pak1	0,19
1439443_x_at	transketolase	Tkt	0,20
1418643_at	tetraspanin 13	Tspan13	0,22
1418196_at	telomerase associated protein 1	Tep1	0,20
1452249_at	prickle like 1 (Drosophila)	Prickle1	0,19
1449534_at	synaptonemal complex protein 3	Sycp3	0,30
1416433_at	replication protein A2	Rpa2	0,24
1426713_s_at	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	Eprs	0,23
1424256_at	retinol dehydrogenase 12	Rdh12	0,21
1449069_at	zinc finger protein 148	Zfp148	0,31
1434053_x_at	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1F0 complex, subunit e	Atp5k	0,22
1450925_a_at	ribosomal protein S27-like	Rps27l	0,25
1448395_at	secreted frizzled-related sequence protein 1	Sfrp1	0,20
1430820_a_at	bobby sox homolog (Drosophila)	Bbx	0,23
1422804_at	serine (or cysteine) peptidase inhibitor, clade B, member 6b	Serpnb6b	0,24
1422433_s_at	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	Idh1	0,26
1418852_at	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 1 (muscle)	Chrna1	0,32
1438761_a_at	ornithine decarboxylase, structural 1	Odc1	0,21
1417354_at	endoplasmic reticulum chaperone SIL1 homolog (S. cerevisiae)	Sil1	0,22
1418561_at	splicing factor 3b, subunit 1	Sf3b1	0,26
1433485_x_at	G protein-coupled receptor 56	Gpr56	0,27
1449072_a_at	RIKEN cDNA 2510005D08 gene	2510005D08Rik	0,20
1438161_s_at	replication factor C (activator 1) 4	Rfc4	0,24
1423350_at	suppressor of cytokine signaling 5	Socs5	0,22
1460167_at	aldehyde dehydrogenase family 7, member A1	Aldh7a1	0,29
1452287_at	Musashi homolog 1(Drosophila) (Msi1h), mRNA	Msi1h	0,18

1460185_at	keratin complex 2, basic, gene 18	Krt2-18	0,31
1420129_s_at	DNA segment, Chr 10, Wayne State University 52, expressed	D10Wsu52e	0,24
1448356_at	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 2	Ube2d2	0,24
1423265_at	multiple inositol polyphosphate histidine phosphatase 1	Minpp1	0,22
1424182_at	acetyl-Coenzyme A acetyltransferase 1	Acat1	0,24
1451446_at	anthrax toxin receptor 1	Antxr1	0,25
1449014_at	lactamase, beta	Lactb	0,24
1427290_at	keratin complex 2, basic, gene 19	Krt2-19	0,30
1452746_at	ATPase type 13A2	Atp13a2	0,20
1448131_at	mitofusin 2	Mfn2	0,19
1450972_at	RIKEN cDNA 3110040N11 gene	3110040N11Rik	0,17
1427228_at	RIKEN cDNA 2410003B16 gene	2410003B16Rik	0,20
1456424_s_at	phospholipid transfer protein	Pltp	0,19
1417539_at	solute carrier family 35	Slc35a1	0,18
1419124_at	RIKEN cDNA 2210010L05 gene	2210010L05Rik	0,30
1451532_s_at	six transmembrane epithelial antigen of the prostate 1	Steap1	0,23
1453019_at	nuclear VCP-like	Nvl	0,17
1424955_at	coiled-coil domain containing 5	Ccdc5	0,21
1416285_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1	Ndufc1	0,27
1426442_at	glycoprotein m6a	Gpm6a	0,27
1420941_at	regulator of G-protein signaling 5	Rgs5	0,20
1448307_at	Down syndrome critical region homolog 2 (human)	Dscr2	0,20
1427923_at	zinc metalloproteinase, STE24 homolog (S. cerevisiae)	Zmpste24	0,31
1451903_at	kynureninase (L-kynurenine hydrolase)	Kynu	0,30
1417403_at	ELOVL family member 6, elongation of long chain fatty acids (yeast)	Elovl6	0,29
1424291_at	nucleoporin 93	Nup93	0,29
1423227_at	keratin complex 1, acidic, gene 17	Krt1-17	0,28
1417480_at	f-box only protein 9	Fbxo9	0,21
1418301_at	interferon regulatory factor 6	Irf6	0,24
1452823_at	glutathione S-transferase kappa 1	Gstk1	0,22
1450567_a_at	procollagen, type II, alpha 1	Col2a1	0,24
1454454_at	---	---	0,26
1452000_s_at	seryl-aminoacyl-tRNA synthetase 1	Sars1	0,23
1450956_at	stearoyl-coenzyme A desaturase 3	Scd3	0,20
1424604_s_at	sulfatase modifying factor 1	Sumf1	0,24
1449365_at	endothelial differentiation, sphingolipid G-protein-coupled receptor	Edg8	0,25
1455298_at	Inhibitor of DNA binding 4 (Id4), mRNA	Idb4	0,20
1437141_x_at	dymeclin	Dym	0,18
1425291_at	forkhead box J1	Foxj1	0,21
1452368_at	breakpoint cluster region homolog	Bcr	0,27
1437185_s_at	thymosin, beta 10	Tmsb10	0,18
1424680_at	expressed sequence BB146404	BB146404	0,30
1448497_at	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency	Ercc3	0,24
1424522_at	HEAT repeat containing 1	Heatr1	0,20
1427378_at	keratinocyte associated protein 1	Krtcap1	0,31
1456055_x_at	polymerase (DNA directed), delta 1, catalytic subunit	Pold1	0,21
1452012_a_at	exosome component 1	Exosc1	0,25
1418285_at	ephrin B1	Efnb1	0,27
1433445_x_at	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1	Hmgcs1	0,23
1434128_a_at	zinc finger protein 574	Zfp574	0,24
1429137_at	RIKEN cDNA 2810422O20 gene	2810422O20Rik	0,26
1417118_a_at	N-acetyltransferase ARD1 homolog (S. cerevisiae)	Ard1	0,28
1436343_at	chromodomain helicase DNA binding protein 4	Chd4	0,28
1449131_s_at	CD1d1 antigen	Cd1d1	0,27
1456120_at	RIKEN cDNA 3110001I20 gene	3110001I20Rik	0,30
1448502_at	solute carrier family 16	Slc16a7	0,28

1455129_at	Metadherin	Mtdh	0,23
1416952_at	ATPase, H ⁺ transporting, V1 subunit D	Atp6v1d	0,32
1460742_at	asparagine-linked glycosylation 3 homolog	Alg3	0,27
1419215_at	aldehyde oxidase 4	Aox4	0,23
1416445_at	RIKEN cDNA 2810405J04 gene	2810405J04Rik	0,23
1417956_at	cell death-inducing DNA fragmentation factor	Cidea	0,27
1427020_at	scavenger receptor class A, member 3	Scara3	0,23
1421782_a_at	submaxillary gland androgen regulated protein 2	Smr2	0,22
1433984_a_at	malate dehydrogenase 2, NAD (mitochondrial)	Mdh2	0,24
1421978_at	glutamic acid decarboxylase 2	Gad2	0,31
1451924_a_at	endothelin 1	Edn1	0,25
1416362_a_at	FK506 binding protein 4	Fkbp4	0,23
1417587_at	timeless homolog (Drosophila)	Timeless	0,27
1450668_s_at	heat shock protein 1 (chaperonin 10)	Hspe1	0,24
1452767_at	ribosome binding protein 1	Rrbp1	0,19
1416608_a_at	cDNA sequence BC004004	BC004004	0,19
1423844_s_at	cystathionine beta-synthase	Cbs	0,26
1419224_at	cat eye syndrome chromosome region	Cecr6	0,30
1438625_s_at	necdin /// PCTAIRE-motif protein kinase 1	Ndn /// Pctk1	0,19
1417294_at	aldo-keto reductase family 7	Akr7a5	0,24
1426901_s_at	calmodulin binding transcription activator 2	Camta2	0,26
1426482_at	IF-inducible double stranded RNA dependent inhibitor	Prkrir	0,23
1418545_at	WASP family 1	Wasf1	0,18
1431320_a_at	myosin Va	Myo5a	0,22
1436266_x_at	chromobox homolog 1 (Drosophila HP1 beta)	Cbx1	0,32
1422525_at	ATP synthase, H ⁺ transporting	Atp5k	0,26
1437985_a_at	RIKEN cDNA 2310061I04 gene	2310061I04Rik	0,21
1417596_at	endothelial precursor protein B9	Eppb9	0,23
1452680_at	small nuclear ribonucleoprotein D2	Snrpd2	0,21
1424488_a_at	pyrophosphatase (inorganic) 2	Ppa2	0,28
1438322_x_at	farnesyl diphosphate farnesyl transferase 1	Fdft1	0,22
1456393_at	RIKEN cDNA 2310002J21 gene	2310002J21Rik	0,26
1450560_a_at	protein phosphatase 2, regulatory subunit B (B56)	Ppp2r5d	0,17
1421910_at	transcription factor 20	Tcf20	0,18
1439462_x_at	transmembrane emp24-like trafficking protein 10 (yeast)	Tmed10	0,19
1448470_at	fructose biphosphatase 1	Fbp1	0,29
1456086_x_at	polyglutamine binding protein 1	Pqbp1	0,17
1451052_at	component of oligomeric golgi complex 8	Cog8	0,23
1416185_a_at	alcohol dehydrogenase 5 (class III), chi polypeptide	Adh5	0,24
1424748_at	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine	Galnt11	0,20
1425784_a_at	olfactomedin 1	Olfm1	0,23
1421053_at	kinesin family member 1A	Kif1a	0,33
1437461_s_at	RNA-binding region (RNP1, RRM) containing 3	Rnpc3	0,20
1427719_s_at	keratin complex 2, basic, pseudogene 1	Krt2-ps1 //20	0,27
1450880_at	mitochondrial ribosomal protein L16	Mrpl16	0,22
1425881_at	pregnancy-specific glycoprotein 28	Psg28	0,21
1456458_at	RIKEN cDNA 2900091E11 gene	2900091E11Rik	0,27
1417750_a_at	solute carrier family 25, member 37	Slc25a37	0,23
1449212_at	prolactin induced protein	Pip	0,25
1435326_at	expressed sequence AW112037	AW112037	0,18
1423547_at	lysozyme	Lyzs	0,29
1435055_a_at	target of myb1 homolog (chicken) /// similar to TOM1	Tom1	0,25
1417099_at	Ftsj homolog 1 (E. coli)	Ftsj1	0,20
1448876_at	Ellis van Creveld gene homolog (human)	Evc	0,24
1437406_x_at	insulin-like growth factor binding protein 4	Igfbp4	0,29
1420967_at	solute carrier family 25	Slc25a15	0,28
1420820_at	RIKEN cDNA 2900073G15 gene	2900073G15Rik	0,28
1420759_s_at	zinc finger protein 1, Y linked	Zfy1 /// Zfy2	0,23
1448501_at	tetraspanin 6	Tspan6	0,22
1415889_a_at	tumor rejection antigen gp96	Tra1	0,22

1418076_at	suppression of tumorigenicity 14 (colon carcinoma)	St14	0,30
1436704_x_at	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	Mthfd1	0,34
1418524_at	pericentriolar material 1	Pcm1	0,19
1417943_at	guanine nucleotide binding protein	Gng4	0,27
1423553_at	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 3	Dnajb3	0,22
1460324_at	DNA methyltransferase 3A	Dnmt3a	0,19
1428296_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide L	Polr2l	0,22
1416967_at	SRY-box containing gene 2	Sox2	0,27
1427751_a_at	keratin complex 1, acidic, gene 5	Krt1-5	0,31
1427910_at	cystatin E/M	Cst6	0,34
1420641_a_at	sulfide quinone reductase-like (yeast)	Sqrdl	0,25
1452359_at	expressed sequence AA536743	AA536743	0,29
1433659_at	DNA segment, Chr 2, ERATO Doi 435, expressed	D2Ertd435e	0,21
1415762_x_at	mitochondrial ribosomal protein L52	Mrpl52	0,21
1418063_at	keratocan	Kera	0,33
1419680_a_at	elaC homolog 2 (E. coli)	Elac2	0,18
1448250_at	RIKEN cDNA 9030425E11 gene	9030425E11Rik	0,24
1449740_s_at	desmoglein 2	Dsg2	0,29
1452469_a_at	smoothelin	Smtn	0,32
1424614_at	FGF receptor activating protein 1	MGI:2385286	0,29
1418704_at	S100 calcium binding protein A13	S100a13	0,22
1434823_x_at	similar to multiple myeloma overexpression gene 2	---	0,26
1419225_at	calcium channel, voltage-dependent	Cacna2d3	0,22
1451015_at	transketolase	Tkt	0,23
1417102_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 5	Ndubf5	0,20
1438755_at	expressed sequence C80068	C80068	0,31
1438443_at	zinc finger and BTB domain containing 20	Zbtb20	0,21
1429708_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex 11	Ndufa11	0,30
1455105_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 12	Ptpn12	0,29
1449249_at	protocadherin 7	Pcdh7	0,32
1417773_at	N-acetylneuraminic acid synthase (sialic acid synthase)	Nans	0,24
1435477_s_at	Fc receptor, IgG, low affinity IIb	Fcgr2b	0,30
1448770_a_at	ATPase inhibitory factor 1	Atpif1	0,22
1437723_s_at	Der1-like domain family, member 1	Der1	0,21
1451405_at	propionyl-Coenzyme A carboxylase, alpha polypeptide	Pcca	0,24
1448542_at	BRCA2 and CDKN1A interacting protein	Bccip	0,19
1435903_at	CD300A antigen	Cd300a	0,23
1419814_s_at	S100 calcium binding protein A1	S100a1	0,33
1418796_at	C-type lectin domain family 11, member a	Clec11a	0,26
1435965_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	Cnot3	0,23
1426685_a_at	CCR4-NOT transcription complex, subunit 6	Cnot6	0,30
1437338_x_at	Elongation protein 3 homolog (S. cerevisiae), mRNA	Elp3	0,25
1423721_at	tropomyosin 1, alpha	Tpm1	0,31
1448315_a_at	pyrroline-5-carboxylate reductase family, member 2	Pycr2	0,19
1419485_at	forkhead box C1	Foxc1	0,30
1424615_at	FGF receptor activating protein 1	MGI:2385286	0,25
1439405_x_at	RIKEN cDNA 1700051C09 gene (1700051C09Rik), mRNA	1700051C09Rik	0,24
1433705_at	similar to Zinc finger protein 213	BC038178	0,21
1436834_x_at	malate dehydrogenase 1, NAD (soluble)	Mdh1	0,18
1450423_s_at	brix domain containing 1	Bxdc1	0,17
1437450_x_at	RIKEN cDNA 2700060E02 gene	2700060E02Rik	0,24
1460569_x_at	claudin 3	Cldn3	0,30
1416258_at	thymidine kinase 1	Tk1	0,30
1416668_at	RIKEN cDNA 4921531G14 gene	4921531G14Rik	0,25
1460308_a_at	immature colon carcinoma transcript 1	Ict1	0,31
1426067_x_at	chaperonin subunit 3 (gamma)	Cct3	0,19
1427865_at	---	---	0,34
1420512_at	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	Dkk2	0,25
1420249_s_at	chemokine (C-C motif) ligand 6	Ccl6	0,30
1425736_at	CD37 antigen	Cd37	0,28

1429835_at	X-ray repair complementing defective repair	Xrcc1	0,32
1450886_at	germ cell-specific gene 2	Gsg2	0,26
1423038_at	syntaxin 6	Stx6	0,24
1416983_s_at	forkhead box O1	Foxo1	0,22
1418030_at	solute carrier organic anion transporter family	Slco3a1	0,21
1452596_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide K	Polr2k	0,17
1417511_at	Ly1 antibody reactive clone	Lyar	0,25
1448818_at	wingless-related MMTV integration site 5A	Wnt5a	0,30
1417490_at	cathepsin B	Ctsb	0,34
1434396_a_at	myosin, light polypeptide 6, alkali	Myl6	0,25
1418455_at	coatamer protein complex, subunit zeta 2	Copz2	0,23
1423506_a_at	neuronatin	Nnat	0,31
1448403_at	leucyl-tRNA synthetase	Lars	0,23
1456627_at	Ubiquilin 2, mRNA (cDNA clone IMAGE:4009660)	Ubqln2	0,24
1424269_a_at	myosin, light polypeptide 6, alkali	Myl6 /// LOC432856	0,22
1423384_s_at	testis expressed gene 261	Tex261	0,28
1456196_x_at	FK506 binding protein 1a	Fkbp1a	0,25
1416233_at	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 2 (beta)	Eif3s2	0,24
1451555_at	neurolysin (metallopeptidase M3 family)	Nln	0,18
1415943_at	syndecan 1	Sdc1	0,33
1416630_at	inhibitor of DNA binding 3	Id3	0,22
1439433_a_at	solute carrier family 35 (UDP-galactose transporter	Slc35a2	0,19
1417285_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 5	Ndufa5	0,21
1438993_a_at	ATPase, H+ transporting, V1 subunit D	Atp6v1d	0,29
1451517_at	Rho-related BTB domain containing 2	Rhobtb2	0,23
1455692_x_at	RIKEN cDNA 1700097N02 gene	1700097N02Rik	0,33
1451561_at	cDNA sequence BC058674	BC058674	0,29
1419323_at	peptidyl arginine deiminase, type I	Padi1	0,29
1434044_at	replication initiator 1	Repin1	0,27
1455632_at	Transcribed locus	---	0,19
1456305_x_at	oocyte specific homeobox 1 /// similar to OBOX3	Obox1-5	0,24
1455179_at	membrane protein, palmitoylated 7	Mpp7	0,17
1435277_x_at	expressed in non-metastatic cells 1, protein	Nme1	0,21
1437621_x_at	3-phosphoglycerate dehydrogenase	Phgdh	0,26
1435162_at	Protein kinase, cGMP-dependent, type II (Prkg2), mRNA	Prkg2	0,21
1427017_at	special AT-rich sequence binding protein 2	Satb2	0,22
1424121_at	COMM domain containing 1	Comm1	0,29
1427173_a_at	mitochondrial ribosomal protein S33	Mrps33	0,24
1417840_at	RIKEN cDNA 1500031L02 gene	1500031L02Rik	0,31
1418635_at	ets variant gene 3	Etv3	0,29
1437401_at	Insulin-like growth factor 1	Igf1	0,29
1449130_at	CD1d1 antigen	Cd1d1	0,30
1448533_at	cytoskeleton-associated protein 1	Ckap1	0,19
1437454_a_at	thioredoxin domain containing 14	Txndc14	0,25
1434553_at	transmembrane protein 56	Tmem56	0,25
1448109_a_at	ribosomal protein L26	Rpl26	0,30
1437309_a_at	replication protein A1	Rpa1	0,33
1448564_at	calcium and integrin binding 1 (calmyrin)	Cib1	0,26
1423704_at	lysophospholipase 3	Lypla3	0,23
1422735_at	forkhead box Q1	Foxq1	0,30
1459922_at	expressed sequence AI646383	AI646383	0,28
1421145_at	solute carrier family 26 (sulfate transporter), member 2	Slc26a2	0,22
1448374_at	mediator of RNA polymerase II transcription	Med28	0,28
1426783_at	GCN5 general control of amino acid synthesis-like 2 (yeast)	Gcn5l2	0,27
1436301_at	receptor interacting protein kinase 5	Ripk5	0,24
1418006_at	RIKEN cDNA 5830416A07 gene	5830416A07Rik	0,19
1415966_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 1	Ndufv1	0,29
1419555_at	E74-like factor 5	Elf5	0,28
1449509_at	small EDRK-rich factor 1	Serf1	0,29
1449012_s_at	fibronectin type III domain containing 4	Fndc4	0,23

1452189_at	RIKEN cDNA 9430077D24 gene	9430077D24Rik	0,20
1448479_at	proteasome, 26S subunit, non-ATPase, 3	Psmd3	0,23
1418702_a_at	RIKEN cDNA 2810428115 gene	2810428115Rik	0,21
1417697_at	sterol O-acyltransferase 1	Soat1	0,30
1437032_x_at	RNA binding motif protein 14	Rbm14	0,24
1452157_at	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	Eprs	0,25
1437211_x_at	ELOVL family member 5	Elovl5	0,25
1424991_s_at	thymidylate synthase /// thymidylate synthase, pseudogene	Tyms /-ps	0,30
1439350_s_at	CDC91 cell division cycle 91-like 1 (S. cerevisiae)	Cdc91l1	0,18
1438244_at	nuclear factor I/B	Nfib	0,24
1449118_at	dihydrolipoamide branched chain transacylase E2	Dbt	0,23
1416269_at	ATP synthase, H+ transporting	Atp5j2	0,26
1452126_at	zinc finger protein 160	Zfp160	0,23
AFFX-MURINE	---	---	0,24
1448887_x_at	fractured callus expressed transcript 1	Fxc1	0,18
1451701_x_at	claudin 3	Cldn3	0,32
1436064_x_at	ribosomal protein S24	Rps24	0,31
1429252_at	RIKEN cDNA 0610010K14 gene (0610010K14Rik), mRNA	0610010K14Rik	0,25
1448005_at	SAM and SH3 domain containing 1	Sash1	0,25
1422852_at	calcium and integrin binding family member 2	Cib2	0,24
1416123_at	cyclin D2	Ccnd2	0,31
1423242_at	mitochondrial ribosomal protein S36	Mrps36	0,25
1416301_a_at	early B-cell factor 1	Ebf1	0,23
1436722_a_at	actin, beta, cytoplasmic	Actb	0,24
1416627_at	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	Spint1	0,33
1424088_at	melanocyte proliferating gene 1	MGI:1929864	0,23
1421612_a_at	H2A histone family, member Y2	H2afy2 /// H2afy3	0,19
1437398_a_at	aldehyde dehydrogenase 9, subfamily A1	Aldh9a1	0,25
1416469_at	leucine zipper protein 1	Luzp1	0,33
1418046_at	nucleosome assembly protein 1-like 2	Nap1l2	0,24
1455505_at	GATA zinc finger domain containing 2A, mRNA	BC031407	0,24
1420123_at	T-cell leukemia translocation altered gene	Tcta	0,23
1437614_x_at	zinc finger, DHHC domain containing 14	Zdhhc14	0,29
1417113_at	germ cell-less homolog (Drosophila)	Gcl	0,27
1419289_a_at	synaptogyrin 1	Syng1	0,31
1450406_a_at	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 3	St3gal3	0,22
1436363_a_at	nuclear factor I/X	Nfix	0,26
1437226_x_at	MARCKS-like 1	Marcks1	0,22
1421114_a_at	dermatan sulphate proteoglycan 3	Dspg3	0,25
1418934_at	mab-21-like 2 (C. elegans)	Mab21l2	0,19
1448869_a_at	mitochondrial ribosomal protein S16	Mrps16	0,35
1453338_at	signal transducing adaptor molecule	Stam2	0,22
1448811_at	mitochondrial ribosomal protein L2	Mrpl2	0,27
1419019_a_at	A kinase (PRKA) anchor protein 4	Akap4	0,27
1452646_at	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	Trp53inp2	0,28
1456059_at	proteasome, 26S subunit, non-ATPase, 11	Psmd11	0,26
1420626_at	RIKEN cDNA 2410016F19 gene	2410016F19Rik	0,28
1423416_at	SWI/SNF related, matrix associated	Smarcc1	0,20
1449324_at	ERO1-like (S. cerevisiae)	Ero1l /// LOC434220	0,23
1424309_a_at	molybdenum cofactor synthesis 2	Mocs2	0,20
1428330_at	RIKEN cDNA 2610510B01 gene	2610510B01Rik	0,23
1422707_at	phosphoinositide-3-kinase, catalytic	Pik3cg	0,21
1424357_at	transmembrane protein 45b	Tmem45b	0,34
1426180_a_at	submaxillary gland androgen regulated protein 2	Smr2	0,31
1425780_a_at	RIKEN cDNA 0610041E09 gene	0610041E09Rik	0,28
1420163_at	expressed sequence AA511261	AA511261	0,33
1448921_a_at	mitochondrial ribosomal protein S9	Mrps9	0,24
1451888_a_at	odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)	Odz4	0,26
1416782_s_at	PRA1 domain family 2	Praf2	0,19

1426865_a_at	neural cell adhesion molecule 1	Ncam1	0,35
1417275_at	myelin and lymphocyte protein, T-cell differentiation protein	Mal	0,28
1428130_at	lectin, mannose-binding, 1	Lman1	0,28
1438562_a_at	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 2	Ptpn2	0,22
1423259_at	inhibitor of DNA binding 4	Id4	0,33
1417052_at	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type 3	Psmb3	0,36
1419231_s_at	keratin complex 1, acidic, gene 12	Krt1-12	0,33
1438980_x_at	RIKEN cDNA 4732466D17 gene	4732466D17Rik	0,34
1435327_at	expressed sequence AW112037	AW112037	0,27
1419398_a_at	deleted in polyposis 1	Dp1	0,22
1435690_at	RIKEN cDNA 2310008H09 gene	2310008H09Rik	0,23
1424828_a_at	fumarate hydratase 1	Fh1	0,27
1437976_x_at	ribosomal protein L23a	Rpl23a	0,29
1434016_at	zinc and ring finger 2	Znrf2	0,29
1419866_s_at	spinocerebellar ataxia 2 homolog (human)	Sca2	0,28
1448586_at	heat shock 70kDa protein 14	Hspa14	0,26
1449872_at	heat shock protein 3	Hspb3	0,20
1423310_at	trophoblast glycoprotein	Tpbg	0,25
1453722_s_at	splicing factor, arginine/serine-rich 1 (ASF/SF2)	Sfrs1	0,23
1423210_a_at	nucleolar protein family A, member 3	Nola3	0,19
1426796_at	Taxilin alpha (Txlna), mRNA	Txln	0,33
1451161_a_at	EGF-like module containing	Emr1	0,28
1434036_at	metastasis suppressor 1	Mtss1	0,24
1424174_at	Sh3kbp1 binding protein 1	Shkbp1	0,27
1437689_x_at	clusterin	Clu	0,35
1450772_at	wingless-related MMTV integration site 11	Wnt11	0,31
1440221_at	expressed sequence AA408650	AA408650	0,20
1452158_at	glutamyl-prolyl-tRNA synthetase	Eprs	0,30
1434609_at	RIKEN cDNA B930007L02 gene	B930007L02Rik	0,23
1416947_s_at	acetyl-Coenzyme A acyltransferase 1	Acaa1	0,20
1416678_at	COP9 (constitutive photomorphogenic)	Cops3	0,25
1455126_x_at	RIKEN cDNA 2310028O11 gene	2310028O11Rik	0,25
1427154_at	keratin complex 2, basic, gene 17	Krt2-17	0,26
1451080_at	ubiquitin specific peptidase 1	Usp1	0,28
1437907_a_at	tubulin cofactor a	Tbca	0,23
1418186_at	glutathione S-transferase, theta 1	Gstt1	0,29
1428389_s_at	WD repeat domain 43	Wdr43	0,24
1449526_a_at	glycerophosphodiester phosphodiesterase	Gdpd3	0,30
1453991_at	RIKEN cDNA 2810429O05 gene	2810429O05Rik	0,19
1417286_at	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex	Ndufa5	0,31
1418157_at	nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	Nr2f1	0,24
1422186_s_at	cytochrome b5 reductase 3	Cyb5r3	0,27
1427136_s_at	splicing factor, arginine/serine-rich 12	Sfrs12	0,24
1436419_a_at	RIKEN cDNA 1700097N02 gene	1700097N02Rik	0,31
1417829_a_at	RAB15, member RAS oncogene family	Rab15	0,26
1417916_a_at	fractured callus expressed transcript 1	Fxc1	0,23
1425568_a_at	transmembrane protein 33	Tmem33	0,35
1433552_a_at	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide B	Polr2b	0,22
1419105_at	nuclear receptor subfamily 1, group H, member 4	Nr1h4	0,28
1436528_at	Kazal-type serine peptidase inhibitor domain 1	Kazald1	0,23
1434757_at	core-binding factor, runt domain	Cbfa2t2h	0,30
1456748_a_at	4-nitrophenylphosphatase domain	Nipsnap1	0,20
1430694_at	---	---	0,27
1439436_x_at	inner centromere protein	Incenp	0,22
1426324_at	histocompatibility 2, D region locus 1	H2-D1	0,32
1422627_a_at	McKusick-Kaufman syndrome protein	Mkks	0,27
1423787_at	nucleoporin 133	Nup133	0,22
1450860_at	leucine aminopeptidase 3	Lap3	0,33
1416337_at	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	Uqcrb	0,25

1422592_at	catenin (cadherin associated protein), delta 2	Ctnnd2	0,27
1429052_at	protein tyrosine phosphatase, receptor type, D	Ptprd	0,25
1427464_s_at	heat shock 70kD protein 5 (glucose-regulated protein)	Hspa5	0,24
1426741_a_at	RIKEN cDNA 2810421I24 gene	2810421I24Rik	0,22
1420357_s_at	X-linked lymphocyte-regulated 3A	Xlr3a /// Xlr3b	0,27
1434646_s_at	Sin3-associated polypeptide 18	Sap18	0,22
1425336_x_at	histocompatibility 2, K1, K region	H2-K1	0,31
1419605_at	macrophage galactose N-acetyl-galactosamine	Mgl1	0,35
1438416_at	thyroid hormone receptor associated protein 5	Thrap5	0,24
1417353_x_at	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	Snrpa1	0,21
1431665_a_at	translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog b	Timm8b	0,31
1418627_at	glutamate-cysteine ligase , modifier subunit	Gclm	0,35
1415916_a_at	methylenetetrahydrofolate dehydrogenase	Mthfd1	0,24
1419380_at	zinc finger protein 423	Zfp423	0,19
1460214_at	Purkinje cell protein 4	Pcp4	0,19
1452877_at	RIKEN cDNA 2700029M09 gene	2700029M09Rik	0,19
1439122_at	---	---	0,27
1427618_at	cadherin 9	Cdh9	0,26
1427042_at	mal, T-cell differentiation protein 2	Mal2	0,33
1424647_at	gamma-aminobutyric acid (GABA-A) receptor, pi	Gabrp	0,33
1417890_at	pyridoxal (pyridoxine, vitamin B6) phosphatase	Pdpx	0,31
1420116_s_at	golgi phosphoprotein 3	Golph3	0,27
1438992_x_at	activating transcription factor 4	Atf4	0,33
1424117_at	cDNA sequence BC056474	BC056474	0,20
1418737_at	nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 2	Nudt2	0,20
1421529_a_at	thioredoxin reductase 1	Txnrd1	0,20
1418567_a_at	signal recognition particle 14	Srp14	0,23
1451050_at	5'-nucleotidase, cytosolic III	Nt5c3	0,22
1415736_at	prefoldin 5	Pfdn5	0,31
1416687_at	procollagen lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	Plod2	0,33
1455286_at	BTB (POZ) domain containing 1	Btbd1	0,27
1436990_s_at	Nur77 downstream gene 2	MGI:2143558	0,35
1425016_at	Eph receptor B2	Ephb2	0,26
1422533_at	cytochrome P450, family 51	Cyp51	0,32
1435995_at	mitochondrial ribosomal protein L22	Mrpl22	0,20
1448263_a_at	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	Cndp2	0,25
1449353_at	wild-type p53-induced gene 1	Wig1	0,26
1423907_a_at	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 8	Ndufs8	0,34
1439625_at	Keratin associated protein 5-4 (Krtap5-4), mRNA	Krtap5-4	0,22
1448249_at	glycerol-3-phosphate dehydrogenase 1 (soluble)	Gpd1	0,35
1436421_s_at	actin related protein 2/3 complex, subunit 5-like	Arpc5l	0,24
1455940_x_at	WD repeat domain 6	Wdr6	0,20
1460247_a_at	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)	Skp2	0,18
1448352_at	leucine zipper protein 1	Luzp1	0,31
1438847_at	Max dimerization protein 3	Mxd3	0,30
1455897_x_at	high mobility group nucleosomal binding domain 1	Hmgn1	0,17
1452670_at	myosin, light polypeptide 9, regulatory	Myl9	0,25
1450393_a_at	secretory carrier membrane protein 4	Scamp4	0,34
1435178_x_at	anaphase-promoting complex subunit 5	Anapc5	0,35
1420898_at	synaptosomal-associated protein 23	Snap23	0,24
1453096_x_at	ribosomal protein L27	Rpl27	0,32
1426951_at	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1	Crim1	0,36
1420021_s_at	suppressor of zeste 12 homolog (Drosophila)	Suz12	0,34
1459987_s_at	chaperonin subunit 3 (gamma)	Cct3	0,20
1424186_at	RIKEN cDNA 2610001E17 gene	2610001E17Rik	0,33
1415862_at	tyrosinase-related protein 1	Typr1	0,38
1451835_at	SRY-box containing gene 21	Sox21	0,26
1452154_at	isoleucine-tRNA synthetase	Iars	0,35
1418462_at	exosome component 9	Exosc9	0,24

1449194_at	mitochondrial ribosomal protein S25	Mrps25	0,29
1455239_at	RIKEN cDNA 6330512M04 gene	6330512M04Rik	0,20
1451562_at	cDNA sequence BC006662	BC006662	0,23
1420965_a_at	ectodermal-neural cortex 1	Enc1	0,27
1422651_at	adiponectin, C1Q and collagen domain containing	Adipoq	0,34
1420595_at	distal-less homeobox 4	Dlx4	0,21
1425048_a_at	high mobility group box 1	Hmgb1	0,26
1448609_at	thiosulfate sulfurtransferase, mitochondrial	Tst	0,35
1431232_a_at	MAX gene associated	Mga	0,31
1424524_at	RIKEN cDNA 1200002N14 gene	1200002N14Rik	0,30
1429183_at	plakophilin 2	Pkp2	0,21
1437279_x_at	syndecan 1	Sdc1	0,26
1448507_at	EF hand domain containing 1	Efhd1	0,32
1438945_x_at	gap junction membrane channel protein alpha 1	Gja1	0,22
1428794_at	spectrin domain with coiled-coils 1	Specc1	0,24
1419186_a_at	ST8 alpha	St8sia4	0,28
1416663_at	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex, 9	Ndufa9	0,31
1420072_s_at	---	---	0,30
1448796_s_at	transforming growth factor beta regulated gene 4	Tbrg4	0,26
1418783_at	transient receptor potential cation channel	Trpm5	0,33
1415906_at	thymosin, beta 4, X chromosome	Tmsb4x	0,26
1430022_at	ubiquitin-like 1 activating enzyme E1A	Uble1a	0,21
1439241_x_at	steroid 5 alpha-reductase 2-like	Srd5a2l	0,37
1428113_at	RIKEN cDNA 4930403J22 gene	4930403J22Rik	0,24

Anexo 3. Análisis de enriquecimiento GSEA en el ratón $pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}$

Nombre	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
MARTINEZ_RB1_AND_TP53_TARGETS_UP	560	0,5817	2,6004	0,0000	0,0000
MARTINEZ_TP53_TARGETS_UP	559	0,5637	2,5408	0,0000	0,0000
CHEN_LVAD_SUPPORT_OF_FAILING_HEART_UP	79	0,7181	2,5050	0,0000	0,0000
NAGASHIMA_NRG1_SIGNALING_UP	143	0,6281	2,4231	0,0000	0,0000
VARELA_ZMPSTE24_TARGETS_UP	37	0,7491	2,3572	0,0000	0,0000
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CLUSTER_0	69	0,6530	2,2368	0,0000	0,0000
TONKS_TARGETS_OF_RUNX1_RUNX1T1_FUSION_MONOCYTE_DN	39	0,7180	2,2166	0,0000	0,0000
ELVIDGE_HYPOXIA_BY_DMOG_UP	99	0,5901	2,1890	0,0000	0,0007
ELVIDGE_HYPOXIA_UP	121	0,5679	2,1765	0,0000	0,0006
SATO_SILENCED_BY_DEACETYLATION_IN_PANCREATIC_CANCER	31	0,7358	2,1659	0,0000	0,0007
GRAHAM_CML_QUIESCENT_VS_NORMAL_DIVIDING_UP	42	0,6941	2,1626	0,0000	0,0006
GARGALOVIC_RESPONSE_TO_OXIDIZED_PHOSPHOLIPIDS_BLUE_UP	76	0,6053	2,1531	0,0000	0,0006
LIAN_LIPA_TARGETS_6M	78	0,6098	2,1492	0,0000	0,0005
DAUER_STAT3_TARGETS_UP	31	0,7320	2,1261	0,0000	0,0007
UZONYI_RESPONSE_TO_LEUKOTRIENE_AND_THROMBIN	32	0,7202	2,0991	0,0000	0,0008
NAGASHIMA_EGF_SIGNALING_UP	50	0,6387	2,0941	0,0000	0,0009
LENAOUR_DENDRITIC_CELL_MATURATION_DN	82	0,5984	2,0834	0,0000	0,0009
TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_8D_DN	125	0,5429	2,0751	0,0000	0,0009
SMIRNOV_CIRCULATING_ENDOTHELIOCYTES_IN_CANCER_UP	125	0,5436	2,0728	0,0000	0,0010
LIAN_LIPA_TARGETS_3M	65	0,6033	2,0659	0,0000	0,0009
PICCALUGA_ANGIOIMMUNOBLASTIC_LYMPHOMA_DN	83	0,5849	2,0648	0,0000	0,0009
WALLACE_PROSTATE_CANCER_RACE_UP	192	0,5096	2,0645	0,0000	0,0008
CASORELLI_ACUTE_PROMYELOCYTIC_LEUKEMIA_UP	121	0,5407	2,0610	0,0000	0,0009
MCLACHLAN_DENTAL_CARIES_UP	156	0,5237	2,0539	0,0000	0,0011
ONDER_CDH1_TARGETS_3_DN	35	0,6844	2,0464	0,0000	0,0011
TAKEDA_TARGETS_OF_NUP98_HOXA9_FUSION_16D_UP	106	0,5610	2,0409	0,0000	0,0012
JAATINEN_HEMATOPOIETIC_STEM_CELL_DN	147	0,5256	2,0167	0,0000	0,0014
JAEGER_METASTASIS_DN	176	0,5037	2,0137	0,0000	0,0015
ODONNELL_TARGETS_OF_MYC_AND_TFRC_UP	48	0,6128	2,0123	0,0000	0,0015
PRAMOONJAGO_SOX4_TARGETS_UP	40	0,6369	2,0025	0,0000	0,0018
KUNINGER_IGF1_VS_PDGFβ_TARGETS_UP	41	0,6262	1,9976	0,0000	0,0019
MCLACHLAN_DENTAL_CARIES_DN	173	0,4940	1,9833	0,0000	0,0024
HAHTOLA_MYCOSIS_FUNGOIDES_CD4_UP	47	0,6069	1,9776	0,0020	0,0025
ZHANG_RESPONSE_TO_IKK_INHIBITOR_AND_TNF_UP	143	0,5010	1,9698	0,0000	0,0026
PODAR_RESPONSE_TO_ADAPHOSTIN_UP	107	0,5332	1,9625	0,0000	0,0028
RUTELLA_RESPONSE_TO_HGF_DN	169	0,4911	1,9578	0,0000	0,0029
RHEIN_ALL_GLUCOCORTICOID_THERAPY_UP	53	0,5965	1,9457	0,0000	0,0034
NAKAMURA_METASTASIS_MODEL_DN	32	0,6372	1,9286	0,0000	0,0043
ELVIDGE_HIF1A_AND_HIF2A_TARGETS_DN	75	0,5517	1,9265	0,0000	0,0043
BILD_HRAS_ONCOGENIC_SIGNATURE	171	0,4843	1,9262	0,0000	0,0042
ADDYA_ERYTHROID_DIFFERENTIATION_BY_HEMIN	53	0,5770	1,9151	0,0000	0,0045
KIM_WT1_TARGETS_UP	166	0,4800	1,9090	0,0000	0,0050

LEE_LIVER_CANCER_DENA_UP	50	0,5920	1,9081	0,0000	0,0049
NAKAMURA_TUMOR_ZONE_PERIPHERAL_VS_CENTRAL_DN	386	0,4421	1,9062	0,0000	0,0049
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_WELL_VS_POORLY_DN	232	0,4574	1,9009	0,0000	0,0053
ELVIDGE_HIF1A_TARGETS_DN	68	0,5461	1,8941	0,0000	0,0058
YAO_TEMPORAL_RESPONSE_TO_PROGESTERONE_CLUSTER_1	71	0,5379	1,8929	0,0000	0,0058
BUYTAERT_PHOTODYNAMIC_THERAPY_STRESS_UP	547	0,4209	1,8926	0,0000	0,0057
BASSO_CD40_SIGNALING_UP	79	0,5402	1,8876	0,0000	0,0058
CHIARADONNA_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_KRAS_CDC25_DN	48	0,5758	1,8815	0,0022	0,0064
FLECHNER_BIOPSY_KIDNEY_TRANSPLANT_REJECTED_VS_OK_UP	74	0,5292	1,8752	0,0000	0,0068
AMIT_EGF_RESPONSE_120_MCF10A	36	0,6196	1,8677	0,0000	0,0075
VALK_AML_WITH_FLT3_ITD	33	0,6171	1,8627	0,0022	0,0079
CHANG_IMMORTALIZED_BY_HPV31_DN	38	0,5983	1,8585	0,0021	0,0080
HUPER_BREAST_BASAL_VS_LUMINAL_UP	38	0,5899	1,8547	0,0000	0,0084
NGUYEN_NOTCH1_TARGETS_DN	58	0,5556	1,8525	0,0000	0,0085
YAO_HOXA10_TARGETS_VIA_PROGESTERONE_UP	78	0,5170	1,8475	0,0000	0,0089
TSAI_RESPONSE_TO_IONIZING_RADIATION	101	0,5017	1,8444	0,0000	0,0091
RAMALHO_STEMNESS_DN	69	0,5358	1,8410	0,0000	0,0093
KOBAYASHI_EGFR_SIGNALING_24HR_UP	65	0,5452	1,8393	0,0000	0,0093
SPIRA_SMOKERS_LUNG_CANCER_UP	32	0,6204	1,8363	0,0000	0,0095
MARTINEZ_RB1_TARGETS_UP	610	0,4065	1,8352	0,0000	0,0094
UDAYAKUMAR_MED1_TARGETS_DN	180	0,4603	1,8328	0,0000	0,0096
RICKMAN_HEAD_AND_NECK_CANCER_C	63	0,5346	1,8316	0,0000	0,0095
WINTER_HYPOXIA_METAGENE	186	0,4554	1,8296	0,0000	0,0096
VERHAAK_AML_WITH_NPM1_MUTATED_UP	130	0,4790	1,8239	0,0000	0,0100
SEKI_INFLAMMATORY_RESPONSE_LPS_UP	68	0,5225	1,8182	0,0000	0,0107
ONDER_CDH1_TARGETS_2_DN	318	0,4190	1,8167	0,0000	0,0107
SESTO_RESPONSE_TO_UV_C1	60	0,5460	1,8022	0,0000	0,0126
BILBAN_B_CLL_LPL_DN	30	0,6096	1,7938	0,0044	0,0137
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_35D_UP	127	0,4707	1,7936	0,0000	0,0135
JIANG_TIP30_TARGETS_UP	36	0,5859	1,7928	0,0044	0,0134
LIU_TARGETS_OF_VMYB_VS_CMYB_DN	32	0,6096	1,7873	0,0022	0,0142
MITSIADES_RESPONSE_TO_APLIDIN_UP	296	0,4244	1,7868	0,0000	0,0142
GERY_CEBP_TARGETS	114	0,4740	1,7858	0,0000	0,0141
RICKMAN_TUMOR_DIFFERENTIATED_WELL_VS_MODERATELY_DN	68	0,5166	1,7854	0,0022	0,0140
MENSE_HYPOXIA_UP	63	0,5221	1,7763	0,0000	0,0153
HOUSTIS_ROS	31	0,5985	1,7687	0,0043	0,0163
ZHOU_INFLAMMATORY_RESPONSE_LPS_UP	233	0,4246	1,7637	0,0000	0,0170
WANG_ESOPHAGUS_CANCER_VS_NORMAL_UP	98	0,4764	1,7635	0,0000	0,0168
SWEET_LUNG_CANCER_KRAS_DN	402	0,4000	1,7618	0,0000	0,0169
ONDER_CDH1_TARGETS_1_DN	114	0,4638	1,7595	0,0000	0,0171
KIM_WT1_TARGETS_8HR_UP	137	0,4516	1,7576	0,0000	0,0173
AMIT_EGF_RESPONSE_40_HELA	35	0,5798	1,7510	0,0023	0,0185
MISSIAGLIA_REGULATED_BY_METHYLATION_UP	78	0,4931	1,7485	0,0000	0,0189
CHIARADONNA_NEOPLASTIC_TRANSFORMATION_CDC25_UP	106	0,4644	1,7465	0,0000	0,0191
RASHI_RESPONSE_TO_IONIZING_RADIATION_2	116	0,4653	1,7421	0,0000	0,0199

RICKMAN_HEAD_AND_NECK_CANCER_F	43	0,5569	1,7382	0,0000	0,0207
WANG_HCP_PROSTATE_CANCER	54	0,5162	1,7349	0,0064	0,0211
FOSTER_INFLAMMATORY_RESPONSE_LPS_DN	301	0,4047	1,7344	0,0000	0,0211
MANALO_HYPOXIA_UP	149	0,4475	1,7218	0,0000	0,0237
BROWNE_HCMV_INFECTION_20HR_DN	81	0,4767	1,7218	0,0000	0,0234
WU_SILENCED_BY_METHYLATION_IN_BLADDER_CANCER	34	0,5695	1,7203	0,0022	0,0235
SENGUPTA_NASOPHARYNGEAL_CARINOMA_WITH_LMP1_DN	84	0,4845	1,7199	0,0023	0,0234
RICKMAN_METASTASIS_DN	186	0,4315	1,7168	0,0000	0,0240
OSWALD_HEMATOPOIETIC_STEM_CELL_IN_COLLAGEN_GEL_DN	167	0,4261	1,7118	0,0000	0,0247
HESS_TARGETS_OF_HOXA9_AND_MEIS1_DN	76	0,4895	1,7116	0,0000	0,0245
VANHARANTA_UTERINE_FIBROID_DN	48	0,5314	1,7116	0,0000	0,0243
RUTELLA_RESPONSE_TO_CSF2RB_AND_IL4_DN	227	0,4151	1,7077	0,0000	0,0250
KAN_RESPONSE_TO_ARSENIC_TRIOXIDE	82	0,4848	1,7065	0,0000	0,0251
BROCKE_APOPTOSIS_REVERSED_BY_IL6	107	0,4593	1,6972	0,0023	0,0273
ZHAN_MULTIPLE_MYELOMA_CD1_AND_CD2_DN	35	0,5670	1,6970	0,0045	0,0271
MARKEY_RB1_CHRONIC_LOF_DN	105	0,4575	1,6950	0,0000	0,0273
GEISS_RESPONSE_TO_DSRNA_UP	30	0,5762	1,6939	0,0042	0,0272
AMIT_EGF_RESPONSE_60_HELA	33	0,5593	1,6907	0,0160	0,0277
VERHAAK_AML_WITH_NPM1_MUTATED_DN	172	0,4227	1,6899	0,0000	0,0276
CONCANNON_APOPTOSIS_BY_EPOXOMICIN_UP	168	0,4308	1,6894	0,0000	0,0275
CHARAFE_BREAST_CANCER_LUMINAL_VS_BASAL_DN	317	0,3988	1,6880	0,0000	0,0277
DAZARD_RESPONSE_TO_UV_SCC_DN	73	0,4800	1,6819	0,0023	0,0290
SMID_BREAST_CANCER_NORMAL_LIKE_UP	328	0,3911	1,6793	0,0000	0,0296
MAHAJAN_RESPONSE_TO_IL1A_UP	56	0,5057	1,6778	0,0088	0,0297
OSWALD_HEMATOPOIETIC_STEM_CELL_IN_COLLAGEN_GEL_UP	167	0,4261	1,6767	0,0000	0,0298
HARRIS_HYPOXIA	69	0,4764	1,6633	0,0067	0,0335
AMIT_SERUM_RESPONSE_60_MCF10A	45	0,5216	1,6630	0,0092	0,0333
NING_CHRONIC_OBSTRUCTIVE_PULMONARY_DISEASE_UP	62	0,4875	1,6603	0,0111	0,0338
SENESE_HDAC1_AND_HDAC2_TARGETS_UP	156	0,4232	1,6597	0,0000	0,0338
WANG_BARRETTS_ESOPHAGUS_UP	37	0,5424	1,6567	0,0177	0,0344
ICHIBA_GRAFT_VERSUS_HOST_DISEASE_D7_UP	104	0,4514	1,6540	0,0000	0,0349
JIANG_HYPOXIA_NORMAL	176	0,4148	1,6514	0,0000	0,0355
DAZARD_RESPONSE_TO_UV_NHEK_UP	127	0,4305	1,6502	0,0024	0,0356
SHAFFER_IRF4_TARGETS_IN_PLASMA_CELL_VS_MATURE_B_LYMPHOCYTE	57	0,4989	1,6453	0,0135	0,0370
GRAHAM_CML_QUIESCENT_VS_NORMAL_QUIESCENT_UP	67	0,4815	1,6430	0,0047	0,0375
SCHUETZ_BREAST_CANCER_DUCTAL_INVASIVE_UP	255	0,3905	1,6409	0,0000	0,0381
ZHANG_ANTIVIRAL_RESPONSE_TO_RIBAVIRIN_DN	36	0,5369	1,6350	0,0153	0,0400
PARENT_MTOR_SIGNALING_DN	32	0,5567	1,6340	0,0087	0,0400
DASU_IL6_SIGNALING_UP	41	0,5214	1,6325	0,0129	0,0402
MORI_MATURE_B_LYMPHOCYTE_UP	69	0,4611	1,6208	0,0046	0,0445
THEILGAARD_NEUTROPHIL_AT_SKIN_WOUND_UP	62	0,4824	1,6198	0,0068	0,0445
TONKS_TARGETS_OF_RUNX1_RUNX1T1_FUSION_HSC_UP	133	0,4204	1,6144	0,0024	0,0464
BROWNE_HCMV_INFECTION_30MIN_UP	42	0,5146	1,6133	0,0194	0,0464
RODRIGUES_NTN1_TARGETS_DN	119	0,4250	1,6120	0,0048	0,0466

SOTIRIOU_BREAST_CANCER_GRADE_1_VS_3_DN	31	0,5533	1,6119	0,0168	0,0463
SHIPP_DLBCL_VS_FOLLICULAR_LYMPHOMA_DN	32	0,5444	1,6081	0,0247	0,0475
RUTELLA_RESPONSE_TO_HGF_VS_CSF2RB_AND_IL4_DN	175	0,3975	1,6054	0,0000	0,0483
HOSHIDA_LIVER_CANCER_SURVIVAL_UP	61	0,4802	1,6043	0,0094	0,0484
KHETCHOUMIAN_TRIM24_TARGETS_UP	43	0,4945	1,6042	0,0196	0,0481
FLOTHO_PEDIATRIC_ALL_THERAPY_RESPONSE_UP	39	0,5117	1,6021	0,0231	0,0486
LU_IL4_SIGNALING	57	0,4703	1,6010	0,0068	0,0487
WU_CELL_MIGRATION	141	0,4162	1,6008	0,0000	0,0485
MORI_SMALL_PRE_BII_LYMPHOCYTE_UP	56	0,4806	1,5986	0,0166	0,0490

Anexo 4. Análisis de enriquecimiento GSEA en el ratón control

Nombre	Tamaño	ES	NES	NOM p-val	FDR q-val
MARTINEZ_RB1_AND_TP53_TARGETS_DN	516	-0,6784	-2,9014	0	0
MARTINEZ_TP53_TARGETS_DN	520	-0,6672	-2,8327	0	0
MARTINEZ_RB1_TARGETS_DN	491	-0,5713	-2,4185	0	0
PYEON_HP_V_POSITIVE_TUMORS_UP	47	-0,6360	-1,9720	0	0,0271
MOREAUX_MULTIPLE_MYELOMA_BY_TACI_DN	84	-0,5551	-1,9097	0	0,0480
ZHANG_BREAST_CANCER_PROGENITORS_UP	290	-0,4795	-1,9046	0	0,0424

ORIGINAL ARTICLE

p21 suppresses inflammation and tumorigenesis on pRB-deficient stratified epithelia

C Saiz-Ladera^{1,5}, MF Lara^{1,5}, M Garin², S Ruiz³, M Santos¹, C Lorz¹, R García-Escudero¹, M Martínez-Fernández¹, A Bravo⁴, O Fernández-Capetillo³, C Segrelles¹ and JM Paramio¹

The retinoblastoma gene product (pRb) controls proliferation and differentiation processes in stratified epithelia. Importantly, and in contrast to other tissues, *Rb* deficiency does not lead to spontaneous skin tumor formation. As the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 regulates proliferation and differentiation in the absence of pRb, we analyzed the consequences of deleting p21 in pRb-ablated stratified epithelia (hereafter pRb^{Δp1};p21^{−/−}). These mice display an enhancement of the phenotypic abnormalities observed in pRb^{Δp1} animals, indicating that p21 partially compensates pRb absence. Remarkably, pRb^{Δp1};p21^{−/−} mice show an acute skin inflammatory phenotype and develop spontaneous epithelial tumors, particularly affecting tongue and oral tissues. Biochemical analyses and transcriptome studies reveal changes affecting multiple pathways, including DNA damage and p53-dependent signalling responses. Comparative metagenomic analyses, together with the histopathological profiles, indicate that these mice constitute a faithful model for human head and neck squamous cell carcinomas. Collectively, our findings demonstrate that p21, in conjunction with pRb, has a central role in regulating multiple epithelial processes and orchestrating specific tumor suppressor functions.

Oncogene advance online publication, 14 October 2013; doi:10.1038/onc.2013.417

Keywords: pRb; p21; skin; differentiation; inflammation; tumorigenesis

INTRODUCTION

The pocket protein family (pRb, p107 and p130) has unique and overlapping roles in differentiation and cell cycle control.¹ Of them, the *Rb* gene is the predominant family member mutated in human tumors. This reflects the essential role of pRb in the control of the G1 to S phase transition in cell cycle.^{2,4} *Rb* encodes a nuclear phosphoprotein that actively represses genes required for the G1–S phase transition through the formation of complexes with members of the E2F transcription factors family.⁵ During normal cell cycle progression, pRb is functionally inactivated through phosphorylation by cyclin/cdk complexes. This releases the E2Fs, allowing the G1 to S phase transition. Consistent with this, forced expression of pRb in cells leads to growth arrest, and restoration of *Rb* function in pRb-deficient tumors suppresses tumor growth.⁶ pRb inactivation is further regulated by two families of cdk inhibitors or cki that regulate the cdk kinase activity.^{7,8}

Protein p21, the *Cdkn1a* gene product, belongs to the cki family and is a critical mediator of p53-induced cell cycle arrest.^{9–11} The evidence for the tumor suppressor activity of p21 comes from the analysis of p21-deficient mice,^{12–14} which display increased susceptibility upon carcinogenic treatments^{15–18} and also develop spontaneous tumors in aged mice.¹⁹ Moreover, p21 deficiency aggravates the phenotype of mice with a variety of genetically engineered oncogenic alterations.^{20–24} Interestingly, independent from its functions in cell cycle, p21 also modulates differentiation and apoptosis, through the direct association and

control of several transcription factors and/or transcription coactivators, in specific cell types such as keratinocytes.^{25–30}

The epidermis is a unique model to study proliferation and differentiation. Different lines of evidence suggested the involvement of the pRb pathway in epidermal homeostasis^{31–35} and in the mouse skin carcinogenesis.^{36,39–40} However, due to the early embryonic lethality displayed by *Rb*-deficient mice,^{41–43} the role of *Rb* in mouse skin carcinogenesis has not been established until recently. We and others have used the Cre/loxP technology to inactivate *Rb* gene in epidermis.^{44,45} The pRb deficiency in epidermis (pRb^{Δp1} mice) promotes increased proliferation and altered differentiation, leading to moderate epidermal hyperplasia and hyperkeratosis.⁴⁵ However, no spontaneous tumors were observed in these mice⁴⁵ unless the related gene p107 is also ablated.^{46,47} Moreover, the absence of pRb leads to reduced skin tumor development and increased rate of malignant conversion upon chemical carcinogenesis experiments.^{48,49} These effects are mainly mediated by acute induction of p53, which creates a selective pressure in the benign tumors, leading to premature p53 loss and thus malignant conversion.⁴⁸ In agreement, we found that pRb and p53 cooperate to suppress mouse epidermal tumors⁵⁰ and p107 loss reduces the p53 transcriptional functions in pRb^{Δp1} mice.⁴⁷ Remarkably, spontaneous tumors arising in pRb^{Δp1};p53^{Δp1} mice are highly aggressive, display early signs of chromosomal instability and high metastatic behavior.^{50–52} The genomic profiling of these spontaneous tumors also reveal a significant overlap with human malignancies of multiple tissue

¹Molecular Oncology Unit (ed70A), Division of Biomedicine, Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Madrid, Spain; ²Division of Hematopoietic Innovative Therapies (HIT), Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT)/Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Madrid, Spain; ³Genomic Instability Group, Spanish National Cancer Research Center, Madrid, Spain and ⁴Department of Veterinary Clinical Sciences, University of Santiago de Compostela, Lugo, Spain. Correspondence: Dr C Segrelles or Professor JM Paramio, Molecular Oncology Unit (ed70A), Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT), Ave. Complutense 40, Madrid, E-28040, Spain.
 E-mail: carmen.segrelles@ciemat.es or jesusm.paramio@ciemat.es

⁵These authors contributed equally to this work.

Received 6 February 2013; revised 24 July 2013; accepted 20 August 2013



origin distinguished by poor prognosis, altered p53 status and high metastasis incidence.^{53,54}

Given that (i) p21 is a *bona fide* transcriptional target of p53,^{9,11} (ii) the reported functional cooperation between pRb and p21,^{20–22} and (iii) the involvement of p21 in epidermal homeostasis and carcinogenesis,^{15–18,25,26,28} we sought to generate mice lacking p21 in the absence of epidermal pRb (*Rb^{ΔEpi};K14cre;Cdkn1a* $-/-$, hereafter *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ mice). Importantly, and in contrast to the individual gene knockouts, *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ mice develop an skin inflammatory processes followed by spontaneous tumor development. Based on their histopathology and transcriptome analyses, these tumors resemble human head and neck squamous carcinomas.

RESULTS

Generation and epidermal characteristics of *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ mice

The absence of pRb in epidermis promotes increased proliferation and altered differentiation, but is insufficient to allow tumor development. This might indicate that other proteins may exert the functions of pRb in its absence to suppress tumorigenesis. This seems to be the case for the other pocket protein p107 but not for p130.^{46,47,55} Importantly, these overlapping roles require in some cases the upregulation of the compensating protein.⁵⁶ In genome-wide transcriptome analysis of primary *pRb^{ΔEpi}* keratinocytes and epidermis we have previously observed a clear induction of the *Cdkn1a* gene.^{46,55} This is also observed at the protein level (Figure 1a). This induction suggests that an active pathway involving this cki may limit the growth of pRb-deleted in epidermis as previously reported in other systems.^{20–22}

To confirm this hypothesis, *pRb^{ΔEpi}* mice were bred with p21-deficient mice¹² to generate double-deficient mice. These mice (*pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$), in an enriched FVB background, were obtained at the expected Mendelian ratio. However soon after birth, mutant animals developed a characteristic phenotype that included reduced size, frail appearance, scaliness (hyperkeratosis) and a very sparse hair coat (Figure 1b–d). The hair loss was more evident in the face and snout (Figure 1c). We also noticed the presence of spontaneous wounds (Figure 1d).

Compared with *Rb^{F/F}* as control mice⁴⁶ (Figure 1e), the epidermis of mice lacking p21 (Figure 1f) was indistinguishable and displayed no significant abnormalities, in agreement with our previous observations.⁵⁴ In contrast, the epidermis of mice bearing specific *Rb* ablation displayed mild hyperplasia (increased number of cell layers) and hyperkeratosis (thickening of the stratum corneum) (Figure 1g⁴⁵). These alterations become clearly aggravated by the simultaneous loss of *Cdkn1a* gene (Figure 1h). The *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ mouse epidermis showed severe hyperplasia and hyperkeratosis. By postnatal day (pnd) 30, we also observed inflammatory infiltrates (Figure 1h'), epithelial pustules (microabscesses denoted by an arrow in Supplementary Figure S1A) and parakeratosis (presence of nucleated cells in the stratum corneum, indicating altered terminal differentiation, denoted by arrows in the inset of Figure 1h'). The analysis of several differentiation markers confirmed these alterations, with expanded keratin K5 expression, keratin K10 expression confined to uppermost cell layers and also massive expression of keratin K6 in the interfollicular epidermis (Figure 1i and i'). All these characteristics were dramatically aggravated as compared with *pRb^{ΔEpi}* (Figure 1k and k') or p21-deficient epidermis (Figure 1j and j'), which in turn is indistinguishable from control mice (Figure 1i and i').

The specific ablation of pRb in epidermis results in increased proliferation in the basal layer and also in aberrant proliferation in suprabasal layers.⁴⁵ We thus investigated whether the subsequent loss of p21 also aggravates this effect. Analysis of BrdU incorporation in control (Figure 2a and f), p21 $-/-$ (Figure 2b and f), *pRb^{ΔEpi}*

(Figure 2c and f) and *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ (Figure 2d and f) skin demonstrated significantly increased proliferation in the basal epidermal layer of double-deficient mice. Notably, the proliferation in the suprabasal layers, characteristic of *pRb^{ΔEpi}* epidermis, was also significantly increased in *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ mice (Figure 2e and g). Increased proliferation was accompanied by increased E2F activity as measured by luciferase experiments in primary keratinocytes (Figure 2h), likely as a result of the increased E2F1 protein levels observed (Figure 1a). Finally, we also analyzed whether the disengagement between proliferation and differentiation processes, which is characteristic of *pRb^{ΔEpi}* mouse keratinocytes, was also aggravated in *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ cells. The proliferation of primary keratinocytes was analyzed at different time points upon differentiation induction by increasing the calcium concentration in the culture medium.⁴⁵ In agreement with our previous observations,⁴⁵ the absence of pRb caused a delay in the cell cycle arrest compared with control or p21 $-/-$ cells; however, by 48–72 h in high calcium, control, p21 $-/-$ and *pRb^{ΔEpi}* keratinocytes displayed no significant BrdU incorporation, while in *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ a considerable number of cells still proliferate (Figure 2i). Moreover, when terminally differentiated control cells where re-stimulated by decreasing calcium, they were unable to re-enter cell cycle, whereas *pRb^{ΔEpi}* and *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$, and to a minor extent p21 $-/-$ cells, displayed rates of proliferation close to those observed in non-differentiated cells (Figure 2i).

These results demonstrate that, whereas the loss of p21 causes minor epidermal defects by itself, it leads to an important aggravation of the phenotype generated by the epidermal-specific ablation of *Rb* gene producing severe gross skin alterations affecting proliferation and differentiation of the epidermal cells.

Inflammatory processes in *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ mouse skin

As mentioned above, by pnd 30 the epidermis of *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ mice is characterized by massive inflammatory infiltrates forming abscesses (Supplementary Figure S1A) that cause epidermal swelling and fragility (Supplementary Figure S1B), leading to the formation of wounds (Figure 1d and Supplementary Figure S1B and C). This may contribute to the severe reduction of mouse viability (Supplementary Figure S1D). Although we had previously observed a minor inflammation in adult *pRb^{ΔEpi}*,⁵² these observations were unexpected, so we aimed to characterize them in detail. Compared with control (Figure 3a–d), p21 $-/-$ (Figure 3a'–d') or *pRb^{ΔEpi}* (Figure 3a''–d''), the skin of *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ displayed large numbers of lymphocytes, macrophages, mastocytes and $\gamma\delta$ T cells (Figure 3a'''–d''' and Supplementary Figure S1E). Of note, such inflammatory events were not detected in newborn skin (Supplementary Figure S2).

The inflammatory processes in skin are associated with increased NF κ B and Stat3 signaling and the production of specific cytokines.⁵⁷ To monitor whether these pathways are affected in *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ prior to overt inflammatory events, we studied the expression of key elements of these signaling pathways in newborn skin samples by western blot. The results (Figure 3e, and Supplementary Figure S3) demonstrated activation of Stat3 and NF κ B in double-deficient mouse epidermis as indicated by increased phosphorylation of Stat3 and p65, and the reduced expression of I κ B α (Figure 3e and Supplementary Figure S3B, D and H). In addition, with the exception of a moderate increase of p65 in *pRb^{ΔEpi}* and *pRb^{ΔEpi};p21* $-/-$ newborn mouse epidermis (Figure 3e and Supplementary Figure S3C), we observed no significant differences in the expression of different signaling elements of these pathways such as total Stat3, IKK β , IKK α and/or IKK γ (Figure 3e and Supplementary Figure S3A, E, F and G).

Next we analyzed, using an antibody array, the expression of several cytokines. As the loss of p21 is generalized (that is, also

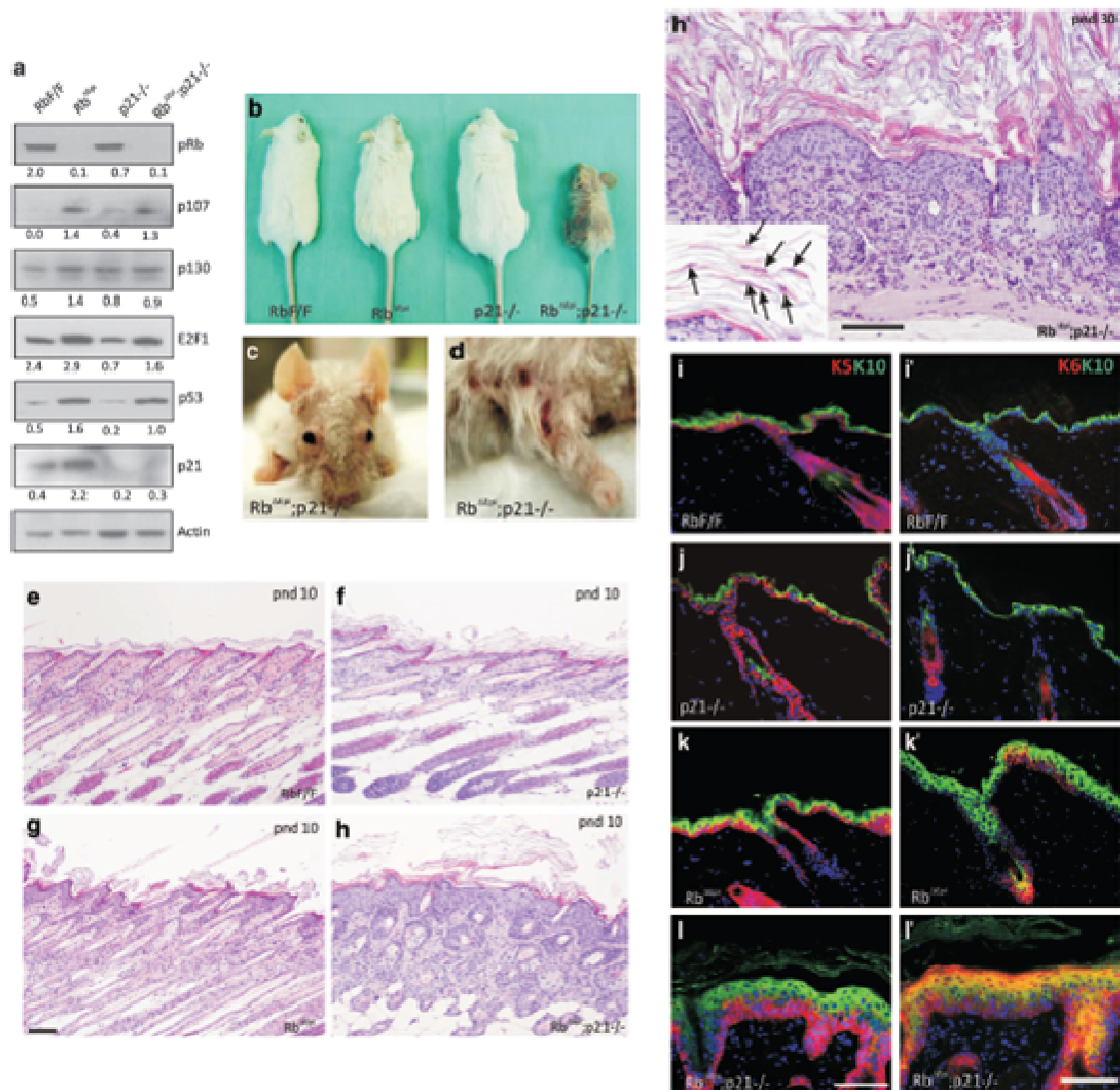


Figure 1. Epidermal phenotype of *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* mice. (a) Representative western blot of primary keratinocyte protein extracts showing the expression of the quoted proteins. Each lane contains a pool of extracts from three different mice of each genotype. The number below each lane denotes the densitometric value of each band normalized according the corresponding actin value (b) Aspect of adult mice bearing epidermal-specific *Rb* loss, *p21*-null and doubly deficient mice. (c, d) Detail of the head (c) and spontaneous wounds (d) in a *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* mouse. (e-h) Representative histology appearance of skin sections from *pRb^{ΔEpi}/F* (e), *p21^{-/-}* (f), *pRb^{ΔEpi}* (g), *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* (h) mouse by pnd 10 and in *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* by pnd 30 (h'). Note the epidermal phenotype in *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* mice characterized by hyperplasia, hyperkeratosis, parakeratosis (denoted by arrows in inset of h') and dermal cell infiltrates. (i-l) Characterization of epidermal differentiation in *pRb^{ΔEpi}/F* (i, i'), *p21^{-/-}* (j, j'), *pRb^{ΔEpi}* (k, k') and *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* (l, l') mouse showing the expression of keratin K5 (in red in i-l), keratin K6 (in red in i'-l') and keratin K10 (in green) by pnd 30. Yellow staining indicates co-expression. Bars = 100 μ m.

affects the possible inflammatory cells) and several of these cytokines were also produced by inflammatory cells, we included in the analysis protein extract of epidermis of pnd 30 from all genotypes, newborn *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* mouse epidermis (without inflammatory signs) and from grafts of newborn *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* mouse epidermis on NOD/SCID mice after 3 months of transplantation. Notably, we noticed the increased presence of inflammatory cells in these grafts (Figure 3f-f'), in spite of the immunodeficiency of the host. This probably indicates that these immune cells were already present in the newborn grafted skin,

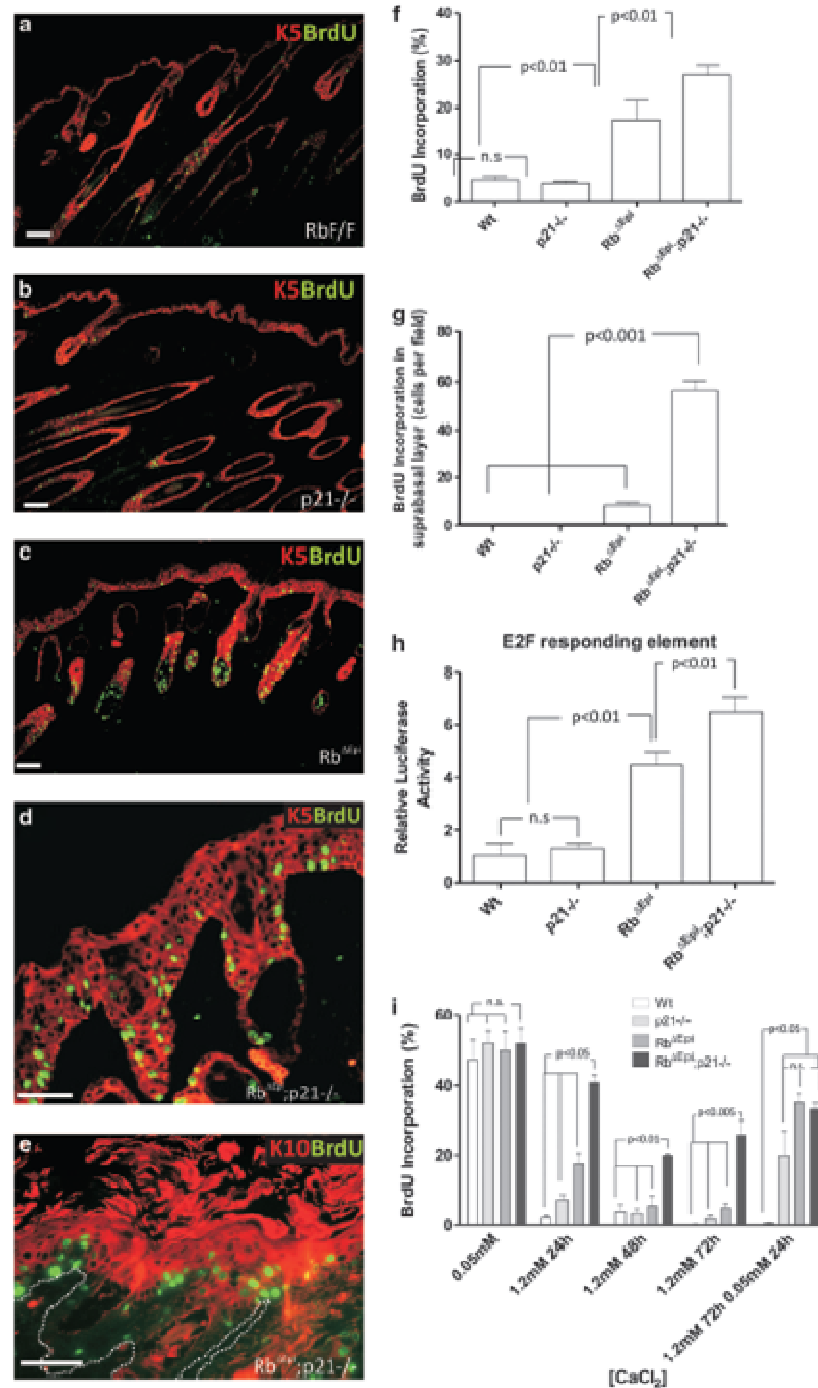
which did not show evidences of inflammation, and they proliferated and survived throughout the entire transplant span. Examples of antibody cytokine array are provided in Figure 4a. The quantitative analysis of the experiments (Figure 4b) showed, in comparison with control, *p21^{-/-}* and *pRb^{ΔEpi}* skin extracts, the increased protein levels of GCSF, GM-CSF, IL16, CXCL1, CCL3, CXCL2 and TREM1, and the decrease in the levels of CCL1 and CXCL9 in *pRb^{ΔEpi}p21^{-/-}* extracts. However, their relative protein levels varied among adult mice (all the above commented changes), newborn (upregulation of GM-CSF, CXCL1 and TREM1



4

and repression of CXCL9 and CCL1) and grafted skin (upregulation of GCSF, GM-CSF, IL16, CXCL1, CXCL2, TREM1 and repression of CXCL9 and CCL1). The comparative analysis of these three situations (overt inflammatory state in $pRb^{ΔEpi}; p21^{-/-}$ mouse

epidermis by pnd 30, no inflammation in newborn $pRb^{ΔEpi}; p21^{-/-}$ mouse epidermis and skin grafts) indicate that the upregulation of GM-CSF, CXCL1 and TREM1 and repression of CXCL9 and CCL1 is probably mediated by the epidermal



keratinocytes rather than being exclusively produced by the inflammatory cells recruited to the skin. Regarding the specific changes, we detected that cytokines responsible for the

recruitment of macrophages (GM-CSF) and neutrophils (CXCL1) were particularly increased. Remarkably, CXCL1 has been shown to promote epidermal wound healing and also squamous tumor

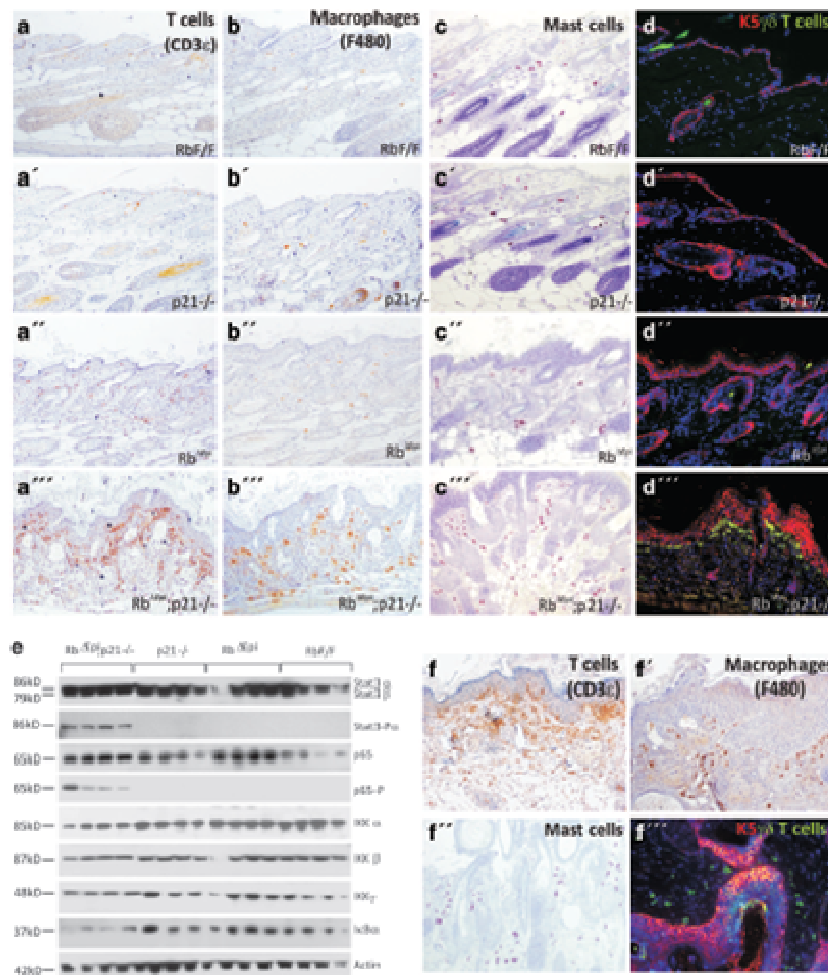


Figure 3. Inflammation in skin of pRb^{ΔE2F}p21^{-/-} mice. (a-f'') Representative immunohistochemistry (a-c''') and immunofluorescence (d-d'') images showing the presence of T cells (CD3ε-positive) (a-a'', f), macrophages (F480 positive) (b-b'', f'), mastocytes (c-c'', f') and γδT cells (d-d'', f'') in pRb^{F/F} (a-d), p21^{-/-} (a'-d'), pRb^{ΔE2F} (a''-d'') and pRb^{ΔE2F}p21^{-/-} (a'''-d''') mouse skin and pRb^{ΔE2F}p21^{-/-} skin grafts (f, f', f''). Bars = 100 μm. (e) Representative western blots showing the expression of the specified proteins in newborn skin extracts of mice of the quoted genotype. Each lane contains a pool of extracts from three different mice of each genotype. The corresponding densitometric analysis of the different bands normalized according the corresponding Actin value is provided in Supplementary Figure S3.

Figure 2. Epidermal proliferation in pRb^{ΔE2F}p21^{-/-} mice. (a-d) Representative double immunofluorescence images showing BrdU incorporation (in green) in epidermis of pRb^{F/F} (a), p21^{-/-} (b), pRb^{ΔE2F} (c) and pRb^{ΔE2F}p21^{-/-} (d, e) mouse skin along with K5 (in red in a-d) or K10 (in red in e). Bars = 100 μm. Dashed line in (e) denotes the epidermal dermal boundaries. (f) Quantitative analysis of BrdU incorporation in K5-positive basal cells in mice of the quoted genotype. (g) Quantitative analysis of BrdU incorporation in K10-positive suprabasal cells in mice of the quoted genotype. Data come from three independent experiments scoring five sections of at least three age-matched mice of each genotype and are shown as mean ± s.e.m. P-values were obtained by one-way ANOVA and the corresponding comparison by Bonferroni test. (h) Relative luciferase activity of E2F responding elements in primary keratinocytes of the quoted genotypes. Data come from three independent experiments. The luciferase values were normalized to those obtained in control RbF/F keratinocytes and are shown as mean ± s.e.m. P-values were obtained by one-way ANOVA and the corresponding comparison by Bonferroni test. (i) Percentage of BrdU incorporation in primary keratinocytes of the quoted genotypes growing under low (0.05) and high (1.2 mM) Ca²⁺ medium for the indicated times and re-stimulated with low Ca²⁺ medium. Data come from the analysis of three independent experiments scoring at least 1000 cells on each and are shown as mean ± s.e.m. P-values were obtained by two-way ANOVA and Bonferroni post test.

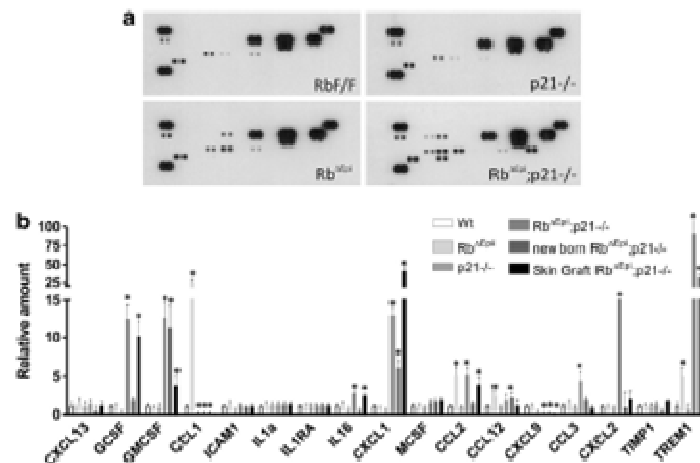


Figure 4. Cytokine production in skin of $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice. **(a, b)** Representative example of pind 30 mice skin samples **(a)** and summary **(b)** of the cytokine arrays analysis of whole skin protein extracts ($n = 3$) obtained from mice of the quoted genotypes. In $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ the cytokine expression of newborn skin and graft skin samples ($n = 3$) were included for comparison. Data come from three independent experiments. The densitometric values were normalized to those obtained in control RbF/F samples and are shown as mean \pm s.e.m. * denotes a P Value < 0.05 as obtained by two-way ANOVA and Bonferroni post test.

development.⁵⁸ We also detected a significant increase of the inflammatory response enhancer (TREM1), which is upregulated in tumor-associated macrophages,⁵⁹ and the reduction of CXCL9, a chemoattractant of peripheral blood lymphocytes and NK cells, with anti-angiogenic activity.⁶⁰

Development of spontaneous tumors in $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice. Progressive weakening and reduced survival in doubly deficient mice were observed. We thus carried out full necropsies in a large cohort of mice of the different genotypes. Upon examination of sections of various tissues, multiple spontaneous tumors were found (Table 1). No spontaneous tumors were observed in control or pRb^{Afp1} mice ($n = 50$ of each) in agreement with our previous data.⁴⁵ In $p21^{-/-}$ mice, we observed a reduced tumor incidence (4/44 mice), which, as reported,¹⁹ only occurred in aged mice (48–52 weeks of age). On the contrary, we found a very high tumor incidence in $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice (39/44 mice, including 5 mice killed by 2–5 weeks, showing no macroscopic growth). These tumors were exclusively of stratified epithelial origin and predominantly correspond to squamous cell carcinomas (SCCs) (Table 1). Tumors were first observed by 2 weeks of age and the vast majority of the mice studied displayed tumors by 40 weeks (Figure 5a). This spontaneous tumor development in $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice could reduce the viability of these mice. Of a particular relevance, we found that 21 of the 44 $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice analyzed displayed SCCs in the tongue, detected as white overgrowths affecting primarily the dorsolateral areas (Figure 5b and b'), which also showed massive $\gamma\delta$ T cell infiltration (Figure 5c). Moreover, and contrary to all the other genotypes (Figure 5d), three out of five transplants generated with $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ skin evolved to form outgrowths suggestive of tumor formation (Figure 5e). Histology analyses confirmed that they correspond to papillomatous lesions and well-differentiated SCCs (Figure 5f) characterized by high grade of differentiation and increased proliferation (Figure 5f').

In conclusion, the combination of pRb and $p21$ deficiency results in the spontaneous development of tumors of stratified epithelia origin. This is in contrast with the absence of tumors in mice bearing the epithelial-specific ablation of Rb gene.⁴⁵ In

Table 1. Tumor development in $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice

Tumor type	Localization	Incidence (%) ^a	Age ^b
SCC	Lips	10/44 (22.7%)	2
SCC	Tongue	21/44 (47.7%)	4
SCC	Oral epithelia	3/44 (6.8%)	4
SCC and CIS	Skin	5/44 (11.3%)	4
Adenosquamous CC	Eye lid	1/44 (2.3%)	6
SCC and CIS	Ear skin	4/44 (9.1%)	12

Abbreviations: adenosquamous CC, adenosquamous cell carcinoma; CIS, carcinoma in situ; SCC, squamous cell carcinoma. ^aNumber of mice showing this specific tumor (percentage in mouse cohort). ^bWeeks of age at which the first tumor was observed.

addition, it is worth mentioning that most of these tumors were not previously reported to occur in $p21$ -null mice, or they appeared at very long latency, thus indicating that pRb and $p21$ cooperate to suppress tumor development in stratified epithelia.

Deregulated gene expression in $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mouse epidermis

To investigate the possible molecular mechanisms underlying the aggravated phenotype, and in particular, the tumor susceptibility displayed by $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice, we carried out microarray analyses from whole-skin RNA of quoted genotyped newborn mice (see Supplementary Materials and methods). We found that, compared with control mouse skin, the simultaneous loss of $Rb1$ and $Cdkn1a$ genes leads to the overexpression of 1445 transcripts and underexpression of 1065 transcripts (Supplementary Tables S1 and S2 and Figure 6a). Enrichment analysis of gene ontology terms⁶¹ indicated that the underexpressed genes were predominantly involved in oxido-reduction and electron chain transport processes, whereas cell adhesion, cytokine-mediated signaling pathway, epithelium development and cell proliferation were the functions predominantly affected by the overexpressed genes, in line with the observed epidermal phenotype of $pRb^{Afp1};p21^{-/-}$ mice (Figure 6b). Of note, we also observed

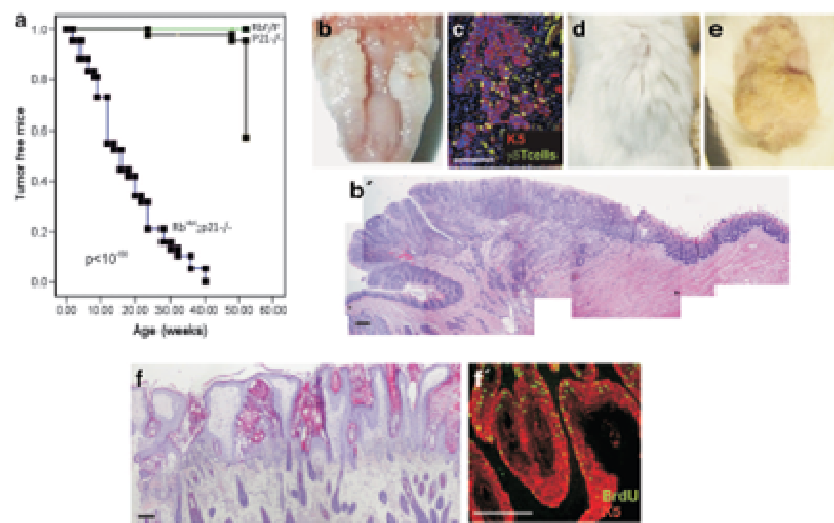


Figure 5. Spontaneous epithelial tumors observed in $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mice. (a) Kaplan–Meier curves showing the spontaneous tumor development in mice of the quoted genotypes. *P*-value was obtained by log-rank test. Macroscopic appearance (b), and histology (b') of spontaneous tongue tumor in $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mice. (d) Immunofluorescence image showing the presence of $\gamma\delta T$ cells in the boundaries of a spontaneous tongue tumor in $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mice. Macroscopic appearance (d), (e) and histology (f) of skin grafts from $pRb^{\Delta Epi}$ (d) or $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ (e, f). (f') Immunofluorescence image showing BrdU incorporation (in green) along with K5 expression (in red) in skin grafts from $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mice. Bars = 200 μm .

that multiple genes affecting specific pathways highly relevant to epidermal homeostasis and tumorigenesis displayed deregulated expression. These included Hedgehog (*Shh*, *Ptch1*, *Smo* and *Shp1*), Notch (*Psen1*, *Hey2*, *Heyf* and *Notch1*) and Wnt/Sox (*Wnt11*, *Wnt5a*, *Wnt2*, *Sox13*, *Sox2*, *Sox21*, *Sox5*, *Lgr5*, *Ltp3*, *Msx2*, *Ctnnb1*, *Myc* and *Ovol1*) signaling pathways. We monitored the expression of some of these genes by qRT–PCR (Supplementary Figure S4A, B and E). Furthermore, as we found deregulated expression of genes acting as activators and inhibitors of these pathways, we also monitored their relative functionality by using common readout genes. The increased expression of *Gli1* (Supplementary Figure S4C) and *Hes1* (Supplementary Figure S4D) supported the activation of Shh and Notch pathways in the epidermis of $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mice. The analysis of *Lgr5*, *Myc*, *Ovol1* and *Axin2* (Supplementary Figure S4E), and the determination of increased active β catenin by western blot (Supplementary Figure S4F) also indicated overactivation of Wnt pathway.

Next, we studied potential transcription factors involved in the observed gene deregulation. Chromatin immunoprecipitation enrichment analysis⁶² revealed a potential involvement of multiple transcription factors in the upregulated and downregulated genes, including E2Fs, Trp53 and Trp63 among others (data not shown). Of note, E2Fs were predicted to bind not only upregulated but also downregulated genes, while p53 appears predominantly associated with the upregulated genes (Figure 6c and c'). The determination of $\Delta Np63$ and TAp63 isoforms by qRT–PCR revealed a significant upregulation of the $\Delta Np63$ but not of the TAp63 isoform in the $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mouse epidermis, and to a minor extent in $p21^{-/-}$ mice (Figure 6d). Regarding the E2F transcription factors, we found increased expression of activator E2Fs (*E2f1* and *E2f2*) and also repressor E2Fs (*E2f4*, *E2f5* and *E2f7*) in the epidermis of $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ newborn mice (Figure 6e).

Finally, gene set enrichment analysis⁶³ was used to analyze whether gene expression differences between control and $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ newborn skin display enrichment of gene sets collected from various sources (see Supplementary Materials and

methods and Supplementary Tables S3 and S4). Among others, we found a significant enrichment of deregulated genes in $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ with that observed in the skin of $pRb^{\Delta Epi};p53^{\Delta Epi}$ and $p53^{\Delta Epi}$ newborn mice (Table 2 and Supplementary Table S3), suggesting a major role of p21 in the p53-dependent signaling in epidermis. This is further reinforced by the significant overlap with other gene sets relative to p53-dependent gene expression, DNA damage and DNA repair (Table 2).

DNA damage in $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mouse epidermis

The gene set enrichment analysis revealed a possible activation of the DNA damage response (DDR) in $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mouse epidermis (Table 2). To confirm these indications, we monitored DDR in mouse skin by analyzing the expression of phosphorylated histone H2AX (γ H2AX). While no significant evidences of γ H2AX were observed in control, $p21^{-/-}$ or $pRb^{\Delta Epi}$ mouse skin (Figure 7a–c), clear nuclear staining was observed in $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mice 30 days after birth (Figure 7d). Moreover, positive γ H2AX was also observed in samples by 10 days after birth (Figure 7d') and in skin transplants (Figure 7d''), predominantly affecting suprabasal keratinocytes, in parallel with p53 induction (Figure 7e). Similar γ H2AX induction was biochemically detected in whole-skin protein extracts (Figure 7f). Noteworthy, the γ H2AX signal in most cases covered all the nucleus, which is the pattern observed upon exposure to replication stress (RS)-generating agents such as hydroxyurea or ATR inhibitors.⁶⁴ In addition, the possible involvement of RS in the DNA damage of $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ mouse epidermis is also suggested by the predominant presence of γ H2AX signal in suprabasal cells; as the cells committed in the differentiation program do not cease DNA replication due to the simultaneous absence of Rb and p21 (Figure 2e, g and i), they could accumulate damages. Further, in agreement with the damage being of replicative origin, the biochemical analyses showed an activation of the ATR–Chk1 pathway (Figure 7g and Supplementary Figure S5), which

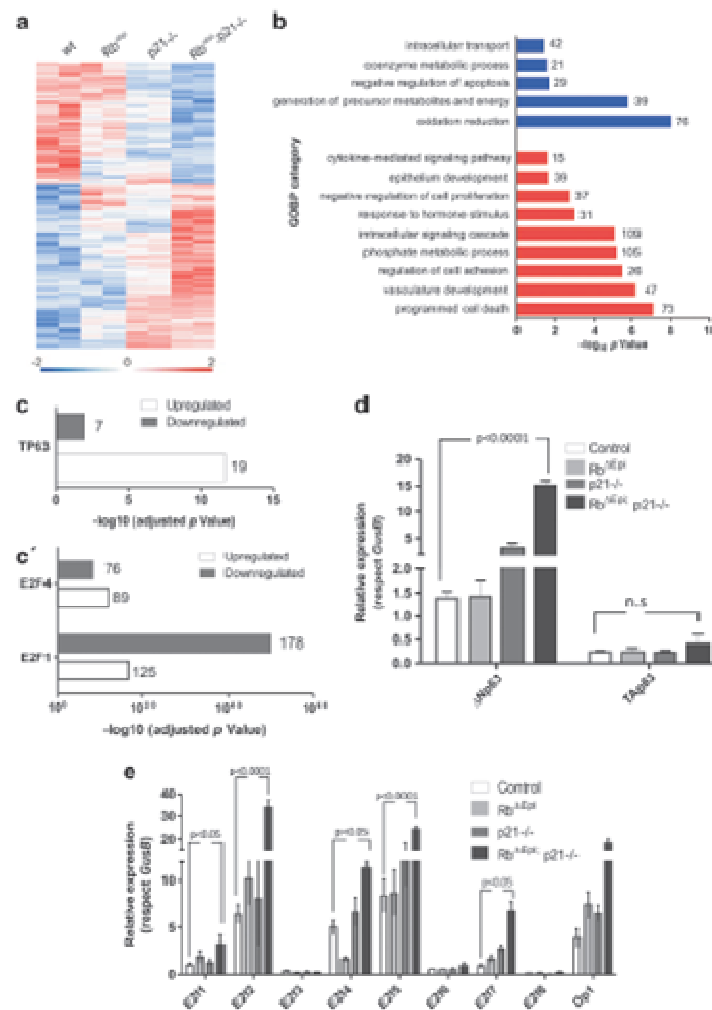


Figure 6. Gene expression of pRb^{ΔEpl};p21^{-/-} newborn mouse skin. **(a)** Heatmap showing the expression of differentially expressed genes between Rb^{ΔEpl}/Rb^{ΔEpl};p21^{-/-} and pRb^{ΔEpl};p21^{-/-} skin samples. The corresponding selected probes (Supplementary Table S1 and S2) were obtained upon microarray analysis and selection as described in Material and methods. **(b)** Gene ontology themes with significant enrichment observed in the pRb^{ΔEpl};p21^{-/-} skin samples (red denotes overexpressed and blue underexpressed genes). **(c, c')** Summary of chromatin immunoprecipitation enrichment analysis data showing the presence of p63 **(c)** and E2Fs **(c')** binding in genes upregulated or downregulated in Rb^{ΔEpl};p21^{-/-} newborn mouse skin. **(d)** Quantitative RT-PCR analysis showing the expression of ΔN and TA p63 isoforms in newborn skin samples from the quoted genotypes. **(e)** Quantitative RT-PCR analysis showing the expression of different E2F members in newborn skin samples from the quoted genotypes. The values for each genotype in **d** and **e** are represented as mean ± s.e.m. *P*-values were obtained using one-way ANOVA and the specific comparison by Bonferroni post test.

coordinates the response against RS.^{65,66} The RS leads to the accumulation of single-stranded DNA, which is prone to recombine and initiate genomic rearrangements.^{65,66} Importantly, the RS-damaged cells are predominantly eliminated through mitotic catastrophe rather than apoptosis, due to the presence of unreplicated chromosomes in mitosis. We thus analyzed the presence of aberrant mitosis and mitotic catastrophes in epidermal skin sections. We found these aberrancies only in pRb^{ΔEpl};p21^{-/-} mouse epidermis (Supplementary Figure S6). On the contrary, we did not detect significant apoptotic events in the skin or in tumors of pRb^{ΔEpl};p21^{-/-} mice, (Supplementary Figure S6E, F and G) despite the increase in p53 levels in the skin or in tumoral lesions

(Figure 7g and Supplementary Figure S6E and F). Thus, and as previously shown for the activation of oncogenes,⁶⁷ concomitant depletion of Rb and p21 on the skin leads to widespread levels of RS, which activate the DDR–p53 axis.

pRb^{ΔEpl};p21^{-/-} mice represent a model of human head and neck SCC

The SCC development observed in oral tissues and tongue of pRb^{ΔEpl};p21^{-/-} mice might indicate that these genetically engineered mice would represent a model of HNSCC. Human head and neck SCC (HNSCC) is the sixth most common human cancer worldwide and, in spite of recent progress in therapeutic management of this disease,⁶⁸ the improvement of overall survival

Gene set name (N) ^a	Description (reference)	Size	NES	FDR Q-value
Martinez_Rb1_And_Tp53_Targets_Up (188)	Genes upregulated in mice with skin-specific double knockout of both RB1 and TP53 by Cre-lox. ³⁰	560	2.60	<0.0001
Martinez_Tp53_Targets_Up (181)	Genes upregulated in mice with skin-specific knockout of TP53. ³⁰	559	2.54	<0.0001
McMurray_Tp53_Hras_Cooperation_Response_Up (10)	Upregulated 'cooperation response genes': responded synergistically to the combination of mutant TP53 and HRAS in YAMC cells (colon). ¹⁰¹	19	1.94	0.001
Brocke_Apoptosis_Reversed_By_IL6 (33)	Genes changed in INA-6 cells (multiple myeloma) by re-addition of IL6 after its initial withdrawal for 12 h. ¹⁰²	107	1.70	0.035
Dutta_Apoptosis_Via_Nfkb (10)	NF-κB target genes involved in the regulation of programmed cell death. ¹⁰³	26	1.64	0.033
Inga_Tp53_Targets (5)	Genes whose promoters contain TP53 response elements. ¹⁰⁴	15	1.60	0.045
Kyng_Dna_Damage_Up (20)	Genes with GO annotation and upregulated after DNA damage in cell lines from young donors. ¹⁰⁵	84	1.55	0.090
Reactome_P53_Independent_Dna_Damage_Response (30)	Genes involved in p53-independent G1/S DNA damage checkpoint (http://www.reactome.org/)	42	-1.71	0.057
Pyeon_Hpv_Positive_Tumors_Up (22)	Downregulated genes in cervical carcinoma and head and neck tumors positive for human papilloma virus (HPV) compared with those negative for HPV. ⁴⁸	47	-1.97	0.027
Martinez_Tp53_Targets_Dn (190)	Genes downregulated in mice with skin-specific knockout of TP53. ³⁰	520	-2.83	<0.0001
Martinez_Rb1_And_Tp53_Targets_Dn (223)	Genes downregulated in mice with skin-specific double knockout of both RB1 and TP53 by Cre-lox. ³⁰	516	-2.90	<0.0001

Abbreviations: FDR: false discovery rate (significant <0.025); NES: normalized enrichment score. NES > 0: enrichment in pRb^{Δp21} p21^{-/-}; NES < 0: enrichment in control. Size: number of genes within each gene set. ^aN: number of enriched genes.

in HNSCC patients is still low.⁶⁸ Therefore, the development of animal models recapitulating the characteristics of human HNSCC would allow advances of new molecularly targeted therapies.^{68–70} Moreover, our gene set enrichment analysis also showed a significant overlap with previous transcriptome studies of human HNSCC (Table 2, Supplementary Tables S3 and S4). Consequently, we aimed to validate pRb^{Δp21} p21^{-/-} mice as a potentially suitable model of human HNSCC.

To this, we compared the genes overexpressed in pRb^{Δp21} p21^{-/-} mice with human HNSCC transcriptome studies using the Oncomine database.^{71,72} The comparison revealed a significant overlap between overexpressed mRNAs in pRb^{Δp21} p21^{-/-} newborn mouse epidermis with homologous mRNAs overexpressed in multiple HNSCC expression data sets (Supplementary Table S5). This overlapping allowed us to obtain a signature of commonly overexpressed gene both in mouse epidermis and human HNSCC studies selected (Figure 8a). Of note, we also observed a significant overlap between the upregulated mouse genes and those downregulated in human HNSCC present in Oncomine database and characterized by increased stage, grade and metastatic likelihood, poor clinical outcome, and also in metastasis compared with primary tumors (Supplementary Table S6). These findings would suggest that the pRb^{Δp21} p21^{-/-} mice might represent a faithful model of good prognosis HNSCC. To test this aspect, we monitored the mouse-human signature in a gene expression data set that contains HNSCC primary tumors with follow-up information of metastatic events⁷³ and shows a significant overlap by gene set enrichment analysis (Figure 8b, b' and c). Unsupervised sample clustering using this common gene signature identified two patient groups (Figure 8d), with statistically significant differences in metastasis-free survival (Figure 8e). Importantly, samples with poor clinical outcome display underexpression of the pRb^{Δp21} p21^{-/-} signature genes, reinforcing the hypothesis that the pRb^{Δp21} p21^{-/-} mice might represent a potential model of human HNSCC characterized by good prognosis. Importantly, human HNSCC is characterized by intense immunosuppression,⁷⁴ probably mediated by myeloid-derived suppressor cell

populations. These cells are a heterogeneous population of early myeloid cells that expand as a consequence of chronic inflammation in response to proinflammatory mediators. The myeloid-derived suppressor cells are mainly found in peripheral blood and tumor tissue and to a lesser extend in lymph nodes. Phenotypically, in mouse-bearing tumors, these cells are identified by the expression of Gr-1 + CD11b + surface markers with subsets expressing CD49d representing the most suppressive ones.⁷⁵ We observed massive enlargement of submaxilar and inguinal lymph nodes in pRb^{Δp21} p21^{-/-} mice (Supplementary Figure S7A) and increased levels of Gr-1 + CD11b + myeloid-derived suppressor cells, which also express CD49d, in peripheral blood and lymph nodes (Supplementary Figure S7B and C). These observations parallel with the mechanism of immune evasion observed in patients with head and neck cancers.⁷⁶ Finally, our comparative study in Oncomine database revealed that upregulated genes are also present in HNSCC cell lines sensitive or resistant to specific chemotherapeutic drugs (Supplementary Table S7), indicating that the pRb^{Δp21} p21^{-/-} mice could also be used as tools to test the specificity of these compounds in tumor therapy or chemoprevention.

DISCUSSION

The retinoblastoma gene plays multiple functions in cell cycle, differentiation and apoptosis. However, in contrast with the widely reported alterations in the so called pRb pathway, mutations of Rb gene are restricted to few human tumors. In agreement with these observations, mouse models reveal that the ablation of Rb does not produce the development of spontaneous tumors in a large number of tissues. This has been attributed in several instances to the functional compensation by other genes such as the Rb family members, p107 and p130.^{77,78} In mouse epidermis, pRb loss generates a characteristic phenotype but not the development of spontaneous tumors.⁴³ Here we show that the phenotype due to pRb loss is further aggravated by the absence of p21, affecting differentiation and proliferation and allowing spontaneous tumor development. These findings are similar to the reported

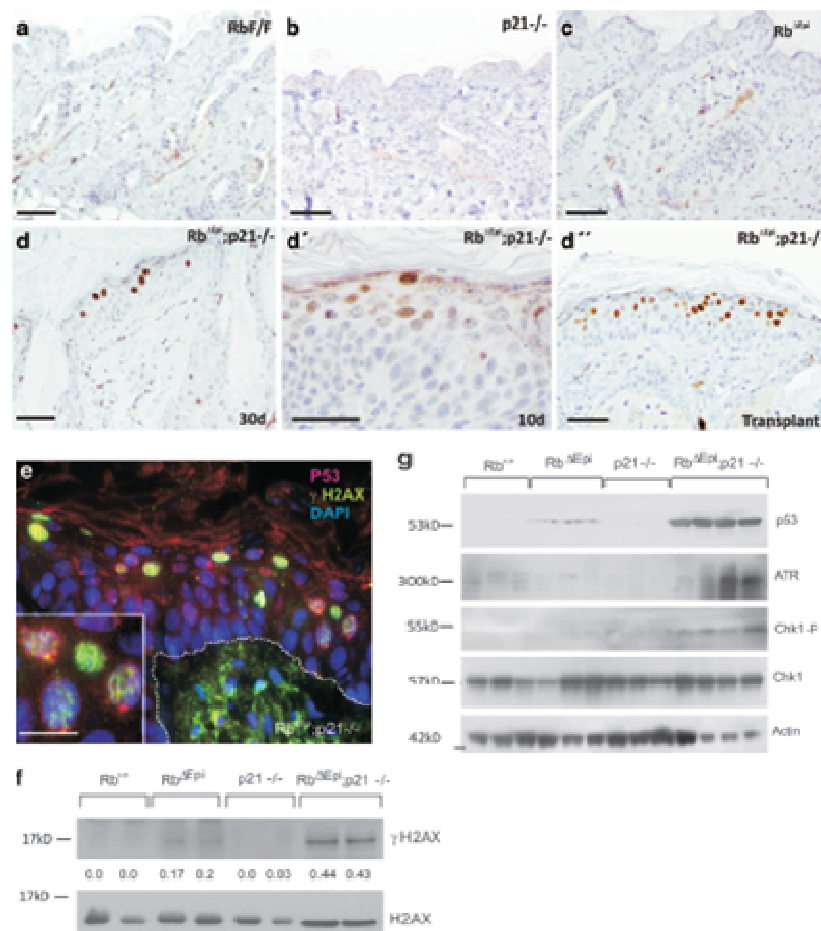


Figure 7. DDR in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice. **(a-d'')** Representative images of the immunohistochemistry detection of histone γH2AX in the epidermis of pRb^{ΔEpi}/F/F (a), p21^{-/-}/F/F (b), pRb^{ΔEpi}/F/F (c) and pRb^{ΔEpi};p21^{-/-}/F/F (d-d'') mice by pnd 30 (a-d) and pnd 10 (d'') and in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} skin grafts (d''). Bar = 50 μm. **(e)** Double immunofluorescence showing the co-expression of p53 (red) and histone γH2AX (green) in the epidermis of pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice. Bar = 10 μm. Dashed line denotes the epidermal-dermal boundaries. Inset denotes a high magnification of double labeled nuclei. **(f)** Western blot analysis showing histone γH2AX expression in skin extracts of mice of the quoted genotype. Histone H2AX was used as loading control. The number below each lane denotes the densitometric value of each band normalized according the corresponding H2AX value. **(g)** Western blot analysis of the quoted DNA damage proteins in the epidermis of mice of the quoted genotypes. In f and g, each lane comes from an independent sample. The corresponding densitometric analysis of the different bands normalized according the corresponding Actin value is provided in Supplementary Figure S5.

overlapping functions between pRb and p107 in this tissue,^{45,46,56} which interestingly also led to oral and perioral spontaneous tumor development.⁴⁷ However, we also observed alterations such as epidermal parakeratosis and an exacerbated inflammatory response not observed in pRb^{ΔEpi};p107 mice, suggesting that the compensating functions of p21 and p107 over pRb deficiency are different. These observations, together with the recently reported spontaneous tumor development mediated by E2F1 loss in pRb^{ΔEpi} mice,⁷⁹ reveal complex and intricate roles of pRb and the retinoblastoma pathway components in stratified epithelia homeostasis through the interaction with other signaling pathways. In this regard, we have also observed deregulation of Wnt, Shh and Notch pathways in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mouse skin.

The p21 protein participates in the pRb pathway through the negative modulation of cdk activity.²⁵ However, through the interaction with several proteins such as transcription factors and/

or transcription coactivators, it also has many functions independent of its roles in cell cycle modulation.^{25-28,30} Interestingly, in certain situations, p21 can control DNA replication even in the absence of pRb, in part through its ability to interact with E2F transcription factors.^{22,80} In this regard, we have observed increased E2F activity and deregulated expression of specific E2F family members, which may partially account for the observed deregulated gene expression in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mouse skin. Collectively, it is thus conceivable that p21 can compensate the absence of pRb, which can explain its roles as tumor suppressor. Indeed, p21-deficient mice are prone to tumor development at advanced age,^{19,81} and its deficiency collaborates with other genetic mouse models to increase tumorigenesis.^{15,24,82} In addition, p21 is a transcriptional target of p53, which is also able to cooperate with pRb to prevent spontaneous tumor development.⁵⁰ Of note, tumors

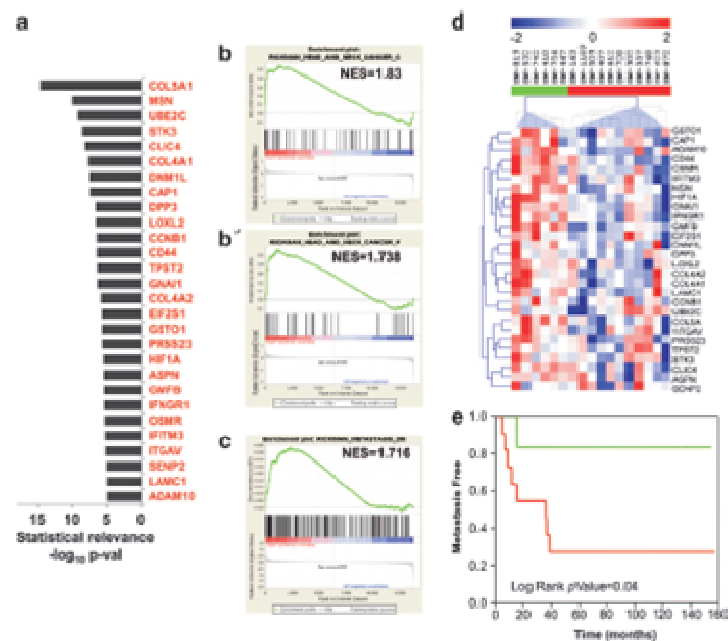


Figure 8. Mouse-human comparative gene expression. (a) Common gene expression signature between $pRb^{\Delta p21-/-}$ mouse and at least four out of seven different human HNSCC studies selected from Supplementary Table S5. Only the most significant comparison from Pyeon study was included. A threshold median $P\text{-value}$ <0.00001 between the possible comparisons was used. (b, b', c) Examples of gene set enrichment analysis endplots of the comparison between genes deregulated in $pRb^{\Delta p21-/-}$ newborn mouse skin and different clusters of the Rickman data set.⁷³ (d) Unsupervised sample clustering using common genes was done in Rickman data set,⁷³ which contains HNSCC primary tumors with follow-up information of metastatic events. Clustering gave rise to two sample groups (d), with statistically significant differences in metastasis-free survival (e). Importantly, samples with poor clinical outcome display underexpression of the $pRb^{\Delta p21-/-}$ signature genes.

generated in $pRb^{\Delta p21-/-}$ $p53^{\Delta p21-/-}$ display chromosomal instability, slight inflammation,⁵² high metastatic behavior⁵¹ and remarkable transcriptome similarities with human tumors characterized by increased malignant behavior and poor prognosis.^{53,54} The similarities in the transcriptome between $pRb^{\Delta p21-/-}$ $p53^{\Delta p21-/-}$ and $pRb^{\Delta p21-/-}$ mouse skin and the presence of aberrant mitosis point to a major role of p21 in mediating p53-dependent signaling in this tissue, at least in the context of pRb deficiency. However, there are important differences between $pRb^{\Delta p21-/-}$ $p53^{\Delta p21-/-}$ and $pRb^{\Delta p21-/-}$ mouse skin, as we did not observe aggravation of the $pRb^{\Delta p21-/-}$ phenotype in $pRb^{\Delta p21-/-}$ $p53^{\Delta p21-/-}$, and we did not detect overt metastasis in $pRb^{\Delta p21-/-}$ mice.

The inflammatory response found in $pRb^{\Delta p21-/-}$ mouse skin is accompanied by abundant lymphocytes, macrophages, mastocytes and $\gamma\delta T$ cells. This inflammatory phenotype is concomitant to the activation of NF κ B and Stat3 signaling, two processes in which p21 has a potential role,²⁹ and increased production of inflammatory cytokines. This inflammatory milieu could favor tumor development, creating an environment prone to malignancy. In this regard, the pattern of cytokines observed in $pRb^{\Delta p21-/-}$ mouse is similar to those observed in different types of tumors.^{58–60,85} For instance, human HNSCC development requires ancillary signals from inflammatory and 'tumor-educated' stromal cells that contribute to the survival, proliferation and maintenance of the undifferentiated state of transformed keratinocytes through increased expression of several cytokines.^{64,86} Rising evidence indicates that the targeting of pro-tumorigenic autocrine/paracrine loops might represent a valuable therapeutic avenue for HNSCC treatment; in part due

to the immunosuppressive characteristics of this type of tumors.⁷⁴ Unfortunately, the key signaling elements of these inflammatory responses remain largely unknown.

The $pRb^{\Delta p21-/-}$ mouse epidermis is also characterized by extensive DNA damage and the subsequent activation of DDR.⁸⁶ Given the roles of pRb and p21 in restricting S-phase entry, this is most likely due to RS, which stands for the accumulation of large patches of single-stranded DNA that are toxic due to their propensity to recombine and initiate genomic rearrangements.^{65,66} This kind of damage is also the same as the one initiated by oncogenes, which also promote a promiscuous S-phase entry.⁶⁷ In addition to restricting replicative damage, extensive DNA damage causes p21 degradation and apoptosis induction, thereby providing an independent link between DNA damage and this cell. Consistent with the known role of the DDR kinases in activating p53, mutant skin presented increased levels of this tumor suppressor, yet no evidences of apoptosis were found. Noteworthy, this could again be due to the origin of the damage being RS, which eliminates cells through mitotic catastrophe rather than apoptosis.

The tumor spectrum observed in $pRb^{\Delta p21-/-}$ mice together with the transcriptome studies support the hypothesis of a functional role for pRb and p21 in oral tumorigenesis and in HNSCC development. Importantly, the landscape of mutations in this type of cancer has been recently reported^{87–90} and no mutations in RB1 or CDKN1A genes were found. However, indirect evidence may sustain this hypothesis. First, pRb is functionally inactivated in most human tumors including HNSCC,⁹¹ probably through the amplification of CCND1 and inactivation of CDKN2A.^{87–89} In addition, p53 is frequently mutated in



HNSCC,^{87–89} leading to altered p21 expression.^{91,92} Nonetheless, an important part of human HNSCC also displays mutations leading to impaired Notch signaling and alterations in Δ Np63 expression.^{87–89} These findings have been associated to impaired terminal differentiation in the tumors.^{87–89} We observed increased expression of Δ Np63 and deregulated expression of Notch pathway genes in pRb^{ΔE9}p21^{−/−} mouse epidermis. However, the increased expression of Hes1 would indicate overall activation of the Notch pathway rather than inhibition. In this regard, it is worth considering that the tumors observed in these mice were predominantly well differentiated. Moreover, part of the tumor suppressor functions of Notch in HNSCC are associated with a cell proliferation arrest mediated by p21 induction,⁸⁹ a process obviously impaired in pRb^{ΔE9}p21^{−/−} mice. The possible relevance of these deregulated signaling pathways in mice would deserve future analysis in clinical samples.

In addition, our transcriptome comparative studies also demonstrate significant similarities between deregulated genes in pRb^{ΔE9}p21^{−/−} mice and human HNSCC characterized by human papilloma virus (HPV) infection and/or good prognosis. HPV infection may induce the development of specific HNSCC subtypes associated with better clinical outcome and characterized by specific gene expression patterns.⁹³ These characteristics have been attributed to the expression of the two main viral oncogenes E7 and E6.⁹⁴ Importantly, the expression of viral E7 oncoprotein interferes with pRb and p21, supporting an active role of these two tumor suppressors in preventing epithelial tumors,^{91,94,95} and HPV E6 oncogene targets p53 tumor suppressor to degradation, thus disturbing p21 expression. Nonetheless, we recently reported that, in artificial human skin prepared using primary keratinocytes engineered to express the E7 protein and engrafted onto nude mice, the expression of E7 oncoprotein produces upregulation of p21 gene while maintaining significant overlap in mRNA and miRNA expression with human HPV-associated pretumoral and tumoral lesions. Given the relevance of HPV in HNSCC development, these observations deserve future research aimed to identify the possible similarities and potential differences between pRb^{ΔE9}p21^{−/−} mouse tumors and human HPV-positive HNSCC as previously reported.⁹⁶

Altogether, the present study reveals relevant and cooperative roles of pRb and p21 in epidermis and other stratified epithelia, affecting in a cell-autonomous manner proliferation and differentiation and in a non-cell autonomous way other processes such as inflammation. The results presented here support that p21 has a key role in limiting cancer onset in the absence of a pRb pathway, and provide a valuable platform for the study of human epithelial malignancies.

MATERIALS AND METHODS

Mice and histological procedures

All mice husbandry and experimental procedures were approved by the Animal Ethical Committee (CEEA) and conducted in compliance with Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) guidelines. Mice were generated and identified by PCR as described.^{12,46} Samples were fixed in 4% buffered formalin or 70% ethanol, embedded in paraffin wax and sectioned (5 μ m). Mice were injected with bromodeoxyuridine (BrdU; 0.1 mg/g weight in 0.9% NaCl) 1 h before being killed. Immunohistochemistry and immunofluorescence were performed using standard protocols^{90,92,97} on deparaffinized sections using antibodies against K5, K6 (1/500 Covance), K10 (1/50 DE-K10 DakoCytomation), γ H2AX Ser 139 (Upstate), cleaved caspase 3 (1/50, Cell Signaling), γ δ T-cell receptor-FITC (γ δ TCR-FITC) (1/50, BD Pharmingen), Biotin-CD45 (1/50, Pharmingen), F480 (against macrophages, 1/50 Abcam, Cl: A3-1) and CD3 ϵ (against T cells and NK cells, 1/6 DakoCytomation). Mast cells detection was done using Toluidine blue stain, taking advantage of metachromasia properties of these cells (Cerritain). BrdU incorporation was monitored as described.^{98,99} Secondary antibodies were purchased from Jackson

Immunoresearch Laboratory. Control slides were obtained by replacing the primary antibodies with PBS (data not shown). Immunofluorescences were counterstained with DAPI (1/100, Roche).

Cell culture and luciferase assays

Primary keratinocytes cultures and E2F luciferase assays were performed as previously reported^{95,99} using pSV40-Renilla (Promega) and pE2F-Luc (Dr X Lu, Ludwig Institute, London, UK). Two independent transfection experiments (performed in triplicate) were carried out and luciferase activity was normalized to the values obtained with control (RbF/F) cells.

Western blot analysis

Skin and primary keratinocyte extracts were obtained as reported.^{94,99} Total protein (50 μ g) was used for SDS-PAGE, transferred to nitrocellulose (Amersham) and probed with primary antibodies (diluted 1/500) against pRb, p107, p130, E2F1 (Santa Cruz), p21 (Abcam), p53 (Novocastrol), phospho Tyr-705 Stat3, Stat3, phospho Ser 536 p65 (Cell Signaling), ATR (Serotec), phospho Ser345-Chk1, Caspase 3, Paip (Cell Signaling) (diluted 1/200); active β catenin (Millipore) (diluted 1/500); p65, I κ B- α , I κ B- γ (Santa Cruz) (diluted 1/2000); I κ B- α and (1/1000) I κ B- β (Imgenex), γ H2AX Ser 139 (Upstate), Chk1 (Novocastrol) and (1/5000) H2AX (Abcam). Actin (1/500, Santa Cruz) was used to normalize the loading. Chemiluminescence was performed using manufacturer's recommendations (Pierce).

The cytokines panel was analyzed following manufacturer's recommendations (Proteome Profiler Mouse Cytokine, R&D Systems, ARY006). Membranes were incubated with 1 mg of pnd 30 protein extracts from skin of pRb^{ΔE9}, p21^{−/−}, pRb^{ΔE9}p21^{−/−} or Rb^{F/F} (as a control) and from newborn pRb^{ΔE9}p21^{−/−} mouse epidermis after 3 months upon grafting onto NOD/SCID mice. This array screens for relative levels of 40 different cytokines and chemokines. Quantification of the relative expression was determined by QuantityOne software.

Mouse skin grafts

Skin grafting was performed following previous protocols.^{46,100} Briefly, dorsal full-thickness skin pieces of 2 cm² were obtained from pRb^{ΔE9}, p21^{−/−}, pRb^{ΔE9}p21^{−/−} or Rb^{F/F} (as a control) newborn mice (2 days after birth). Donor skin pieces were grafted onto a wound created by removing a similar-sized piece of full-thickness back skin from female immunodeficient NOD/SCID recipient mice, as previously described.¹⁰⁰ Graft-recipient animals were routinely monitored for tumors and killed 12 weeks after grafting.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Pilar Hernández for her excellent technical support on histology preparations and sectioning. The technical support by the personnel of the CIEMAT Animal Facility is specially acknowledged. Grant support: MINECO grants SAF2011-26122-C02-01 and SAF2012-34378, CAM Oncocyte Program Grants S2010/MDM-2470, ISCIII-RETIC grants RD06/0020/0029 and RD12/0036/0009 to JMP, EU FP7-HEALTH-279174, REGENER-AR to MG, ISCIII grant P12/01959 to M.S. MMF is funded by a 'Juan de la Cierva' research fellowship (JC2010-06167) from MICINN. SR is funded by a 'Ramón y Cajal' research fellowship (11-866-25-04) from MICINN. Work in the laboratory of CF is supported by grants from the Spanish Ministry of Science (SAF2011-23753), the Association for International Cancer Research (12-0229), the Howard Hughes Medical Institute and the European Research Council (ERC-210520).

REFERENCES

- Classon M, Hawlow E. The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nat Rev Cancer* 2002; **2**: 910–917.
- Shen CJ, McCormick F. The Rb and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* 2002; **2**: 103–112.
- Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995; **81**: 323–330.
- Burkhardt DL, Sage J. Cellular mechanisms of tumour suppression by the retinoblastoma gene. *Nat Rev Cancer* 2008; **8**: 671–682.
- Dyson N. The regulation of E2F by pRb-family proteins. *Genes Dev* 1998; **12**: 2245–2262.

- 59 Ford JW, McVicar DW. TREM and TREM-like receptors in inflammation and disease. *Curr Opin Immunol* 2009; **21**: 38–46.
- 60 Selvaraj MK, Zhu L, Harris-White M, Kar U, Huang M, Johnson MF et al. Myeloid suppressor cell depletion augments antitumor activity in lung cancer. *PLoS One* 2012; **7**: e40677.
- 61 Dennis Jr. G, Sherman BT, Hosack DA, Yang J, Gao W, Lane HC et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery. *Genome Biol* 2003; **4**: P3.
- 62 Lachmann A, Xu H, Krishnan J, Berger SL, Mazloom AR, Ma'ayan A. ChEA: transcription factor regulation inferred from integrating genome-wide ChIP-X experiments. *Bioinformatics* 2010; **26**: 2438–2444.
- 63 Subramanian A, Tamayo P, Mootha VK, Mukherjee S, Ebert BL, Gillette MA et al. Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; **102**: 15545–15550.
- 64 Toledo LI, Murga IM, Zur R, Soria R, Rodriguez A, Martinez S et al. A cell-based screen identifies ATR inhibitors with synthetic lethal properties for cancer-associated mutations. *Nat Struct Mol Biol* 2011; **18**: 721–727.
- 65 Cimprich KA, Cortez DATR, an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; **9**: 616–627.
- 66 Lopez-Contreras AJ, Fernandez-Capetillo O. The ATR barrier to replication-born DNA damage. *DNA Repair* 2010; **9**: 1249–1255.
- 67 Halazonetis TD, Gorgoulis VG, Bartek J. An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* 2008; **319**: 1352–1355.
- 68 Chin D, Boyle GM, Porceddu S, Thelle DR, Parsons PG, Coman WB. Head and neck cancer: past, present and future. *Expert Rev Anticancer Ther* 2006; **6**: 1111–1118.
- 69 Leeman RJ, Lu VW, Gonds JR. STAT3 as a therapeutic target in head and neck cancer. *Expert Opin Biol Ther* 2006; **6**: 231–241.
- 70 Moel M, Paramio JM. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol Histopathol* 2008; **23**: 1269–1278.
- 71 Rhodes DR, Kalyana-Sundaram S, Mahavisno V, Varambally R, Yu J, Briggs BB et al. Oncomine 3.0: genes, pathways, and networks in a collection of 18,000 cancer gene expression profiles. *Neoplasia* 2007; **9**: 166–180.
- 72 Rhodes DR, Yu J, Shanker K, Deshpande N, Varambally R, Ghosh D et al. ONCOMINE: a cancer microarray database and integrated data-mining platform. *Neoplasia* 2004; **6**: 1–6.
- 73 Ridman DS, Millon R, De Reynies A, Thomas E, Wasyluk C, Müller D et al. Prediction of future metastasis and molecular characterization of head and neck squamous-cell carcinoma based on transcriptome and genome analysis by microarrays. *Oncogene* 2008; **27**: 6607–6622.
- 74 Seefoglu Z, Yapiçak C, Nlenke E, Vairaitzis E. Genetic association of cytokine DNA polymorphisms with head and neck cancer. *Oral Oncol* 2008; **44**: 1093–1099.
- 75 Hale LA, Gatten TF, Koranyi F. Immune suppression: the hallmark of myeloid derived suppressor cells. *Immunol Invest* 2012; **41**: 581–594.
- 76 Pak AS, Wight MA, Matthews JP, Collins SL, Petruzzelli GJ, Young MR. Mechanisms of immune suppression in patients with head and neck cancer: presence of CD34(+) cells which suppress immune functions within cancers that secrete granulocyte-macrophage colony stimulating factor. *Clin Cancer Res* 1995; **1**: 95–103.
- 77 Dannenberg JH, Schuffell L, Dekker M, van der Valk M, Riele HT. Tissue-specific tumor suppressor activity of retinoblastoma gene homologs p107 and p130. *Genes Dev* 2004; **18**: 2952–2962.
- 78 Robanus-Masandag E, Dekker M, van der Valk M, Carozza ML, Jeanny JC, Dannenberg JH et al. p107 is a suppressor of retinoblastoma development in pRb-deficient mice. *Genes Dev* 1998; **12**: 1599–1609.
- 79 Costa C, Santos M, Martínez-Fernández M, Duenas M, Lorz C, García-Escudero R et al. E2F1 loss induces spontaneous tumour development in Rb-deficient epidermis. *Oncogene* 2012; **32**: 2937–2951.
- 80 Afshari CA, Nichols MA, Xiong Y, Mudryj M. A role for a p21-E2F1 interaction during senescence arrest of normal human fibroblasts. *Cell Growth Differ* 1996; **7**: 979–988.
- 81 De la Cueva E, García-Gao I, Herranz M, Lopez P, García-Palencia P, Flores JM et al. Tumorigenic activity of p21(Waf1/Cip1) in thymic lymphoma. *Oncogene* 2006; **25**: 4128–4132.
- 82 Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Collado M, Serrano M. Different co-operating effect of p21 or p27 deficiency in combination with INK4a/ARF deletion in mice. *Oncogene* 2004; **23**: 8231–8237.
- 83 Acharyya S, Oskarsson T, Vanharanta S, Malladi S, Kim J, Morris PG et al. A CXCL1 paracrine network links cancer chemoresistance and metastasis. *Cell* 2012; **150**: 165–178.
- 84 Woods KV, El-Naggar A, Ciberman GL, Gimm EA. Variable expression of cytokines in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines and consistent expression in surgical specimens. *Cancer Res* 1998; **58**: 3132–3141.
- 85 Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ordrey FG, Duffey DC, Smith CW et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 1999; **5**: 1369–1379.
- 86 Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 2009; **461**: 1071–1078.
- 87 Stransky N, Egloff AM, Tward AD, Kostic AD, Cibulski K, Sivachenko A et al. The mutational landscape of head and neck squamous cell carcinoma. *Science* 2011; **333**: 1157–1160.
- 88 Agawal N, Frederick MJ, Pickering CR, Bettgeowda C, Chang K, Li RJ et al. Exome sequencing of head and neck squamous cell carcinoma reveals inactivating mutations in NOTCH1. *Science* 2011; **333**: 1154–1157.
- 89 Pickering CR, Zhang J, Yoo SY, Bengtsson L, Moorthy S, Neskey DM et al. Integrative genomic characterization of oral squamous cell carcinoma identifies frequent somatic drivers. *Cancer Discov* 2013; **3**: 770–781.
- 90 Lui VW, Hedberg ML, Li H, Vangam BS, Pendleton K, Zeng Y et al. Frequent mutation of the PI3K pathway in head and neck cancer defines predictive biomarkers. *Cancer Discov* 2013; **3**: 761–769.
- 91 Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2009; **15**: 6758–6762.
- 92 Perez-Ordóñez B, Beauchemin M, Jordan RC. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Pathol* 2006; **59**: 445–453.
- 93 Pyeon D, Newton MA, Lambert PF, den Boon JA, Sengupta S, Mani CJ et al. Fundamental differences in cell cycle deregulation in human papillomavirus-positive and human papillomavirus-negative head/neck and cervical cancers. *Cancer Res* 2007; **67**: 4605–4619.
- 94 Leemans CR, Brakhuys BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 9–22.
- 95 Shin MK, Balsitis S, Balke T, Lambert PF. Human papillomavirus E7 oncoprotein overrides the tumor suppressor activity of p21/Cip1 in cervical carcinogenesis. *Cancer Res* 2009; **69**: 5656–5663.
- 96 Buitrago-Perez A, Garzalet G, Vazquez-Carballo A, Paramio JM, García-Escudero R. Molecular signature of HPV-induced carcinogenesis: pRb, p53 and gene expression profiling. *Curr Genomics* 2009; **10**: 26–34.
- 97 Santos M, Perez P, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL, Paramio JM. Impaired NF- κ B activation and increased production of tumor necrosis factor alpha in transgenic mice expressing keratin K10 in the basal layer of the epidermis. *J Biol Chem* 2003; **278**: 13422–13430.
- 98 Ruiz S, Segrelles C, Bravo A, Santos M, Perez P, Leis H et al. Abnormal epidermal differentiation and impaired epithelial-mesenchymal tissue interactions in mice lacking the retinoblastoma relatives p107 and p130. *Development* 2003; **130**: 2341–2353.
- 99 Ruiz S, Segrelles C, Santos M, Lora MF, Paramio JM. Functional link between retinoblastoma family of proteins and the Wnt signaling pathway in mouse epidermis. *Dev Dyn* 2004; **230**: 410–418.
- 100 Martínez-Cruz AB, Costa C, Saliz C, Paramio JM, Santos M. In vivo transplantation of genetically modified mouse embryonic epidermis. *Methods Mol Biol* 2010; **585**: 361–367.
- 101 McMurray HR, Sampson ER, Compitello G, Kinsey C, Newman L, Smith B et al. Synergistic response to oncogenic mutations defines gene class critical to cancer phenotype. *Nature* 2008; **453**: 1112–1116.
- 102 Brodeur-Heldrich K, Kietzschmar AK, Pfeifer G, Henze C, Löffler D, Koczan D et al. Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* 2004; **103**: 242–251.
- 103 Dutta J, Fan Y, Gupta N, Fan G, Gellinas C. Current insights into the regulation of programmed cell death by NF- κ B. *Oncogene* 2006; **25**: 6800–6816.
- 104 Ings A, Stord F, Darden TA, Resnick MA. Differential transactivation by the p53 transcription factor is highly dependent on p53 level and promoter target sequence. *Mol Cell Biol* 2002; **22**: 8612–8625.
- 105 Kyng KI, May A, Stevnsner T, Bedier KG, Kolva S, Bohr VA. Gene expression responses to DNA damage are altered in human aging and in Werner Syndrome. *Oncogene* 2005; **24**: 5026–5042.

Supplementary Information accompanies this paper on the Oncogene website (<http://www.nature.com/onc>)

**p21 loss induces skin inflammation and spontaneous
tumor development in mice with specific pRb
ablation in stratified epithelia**

by

Cristina SAIZ-LADERA^{1,2}, María Fernanda LARA^{1,2}, Marina GARÍN³, Sergio RUIZ⁴, Mirentxu SANTOS¹, Corina LORZ¹, Ramón GARCÍA-ESCUDERO¹, Ana BRAVO⁵, Oscar FERNÁNDEZ-CAPETILLO⁴, Carmen SEGRELLES^{1,6} and Jesús M PARAMIO^{1,6}.

SUPPLEMENTARY INFORMATION^{a, b)}

a) This file includes

Supplementary Material and Methods

Supplementary Figures S1-S3

Supplementary Tables S3-S5

References

b) Supplementary Tables S1 and S2 in Excel format are located in an independent online file.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

RNA purification.

Newborn mouse skin was preserved in RNAlater (Ambion), and disrupted and homogenized using Mixer Mill MM301 (Retsch). Total RNA was extracted and purified from 30mg of skin using RNeasy Fibrous Tissue Mini kit (Qiagen) following manufacturers' recommendations. The integrity of the RNA populations was tested in the Bioanalyzer (Agilent). Pool from five RNA whole skin extracts of same genotype were done in each case and analyzed per duplicate in mouse 430A Affymetrix microarrays at the Genomic Facility of the Centro de Investigación del Cáncer (University of Salamanca, Spain).

Affymetrix mouse gene chip 430A analysis

We exported CEL files from Affymetrix GCOS software. Using the web-based tool Gene Expression Profile Analysis Suite (GEPAS, <http://www.gepas.org>, (Vaquerizas et al., 2005)), we subtracted the background with RMA (Irizarry et al., 2003) normalized the chips using quantile method (Bolstad et al., 2003), and finally \log_2 -transformed and mean-centered the intensity values. Further analyses were performed using the MeV software (Saeed et al., 2003). The selection of genes differentially expressed between control and $\text{pRb}^{\Delta\text{Epi}};\text{p21}^{-/-}$ mutant mice was made using SAM analysis ($p < 0.01$, fold change > 2). The cluster Gene Ontology (GO) analysis of Biological Processes using DAVID software (Dennis et al., 2003) (<http://david.abcc.ncifcrf.gov/home.jsp>) from the NIAID/NIH was used to identify functional categories for each T-test analysis. The search for GO terms was made using all themes, listed by p-value based on EASE score (Hosack et al., 2003) and manually curated.

Gene set enrichment analysis.

Gene set enrichment analysis (GSEA) (Subramanian et al., 2005) was used to compare gene expression differences between control and $\text{pRb}^{\Delta\text{Epi}};\text{p21}^{-/-}$ new born skin with other reported datasets included in the "c2.cgp.v3.0" collection from MSigDB database (<http://www.broadinstitute.org/gsea/msigdb/index.jsp>) and from various sources, such as online pathway databases, publications in PubMed, and knowledge of domain experts. A total of 4850 gene sets were analyzed, and a selection of some relevant and statistically significant gene sets was done.

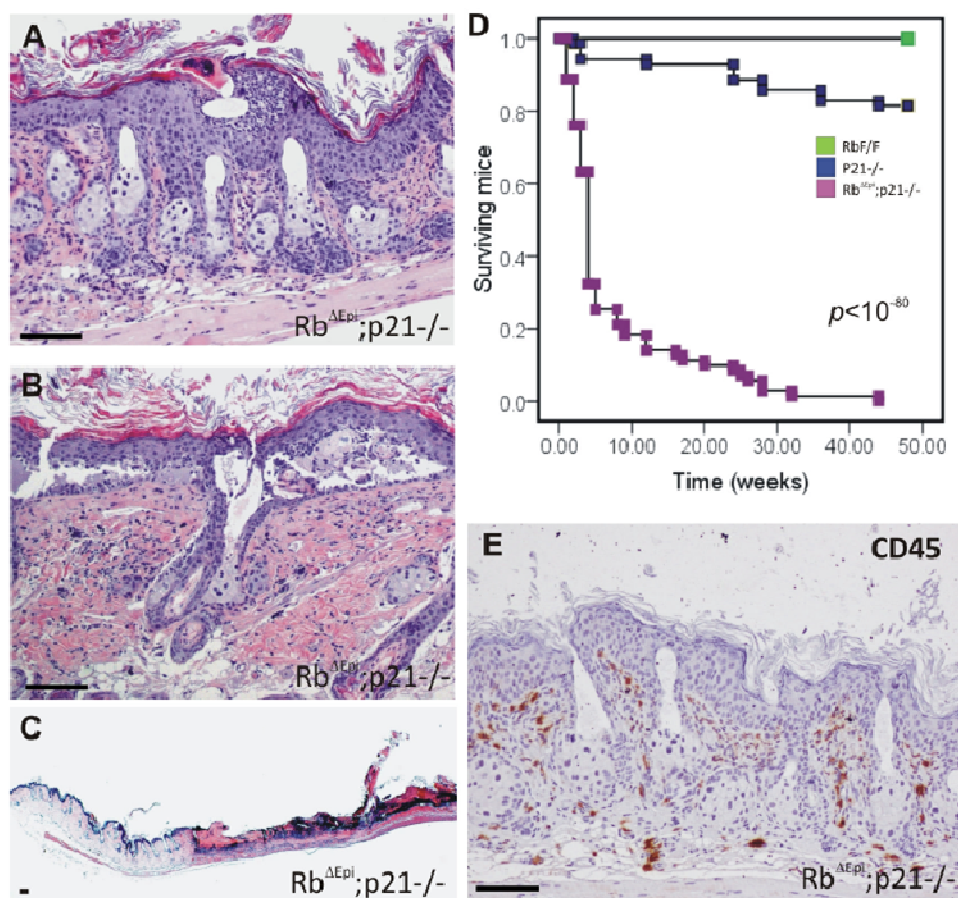
Overlapping analysis in human cancer gene expression studies

Possible overlapping between overexpressed genes in $\text{pRb}^{\Delta\text{Epi}};\text{p21}^{-/-}$ and human HNSCC samples was obtained using the Oncomine database (Rhodes et al., 2007; Rhodes et al., 2004). Association of the overexpressed genes in $\text{pRb}^{\Delta\text{Epi}};\text{p21}^{-/-}$ new born skin with the database signatures was tested using Fisher's exact test, and was considered significant for Odds Ratio > 1.5 , and $p\text{-val} \leq 0.01$. Genes

overexpressed in pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mutant mice were mapped to human gene symbols and loaded into the Oncomine database. We have searched for overlaps using different filtering criteria, based on the type of human cancer comparison performed. These criteria were: Different types of Head and Neck cancer; increased stage of the tumors; high grade, clinical outcome, metastasis and multi-cancer cell lines derived from Head and Neck human tumors sensitive o resistant to specific therapeutics drugs.

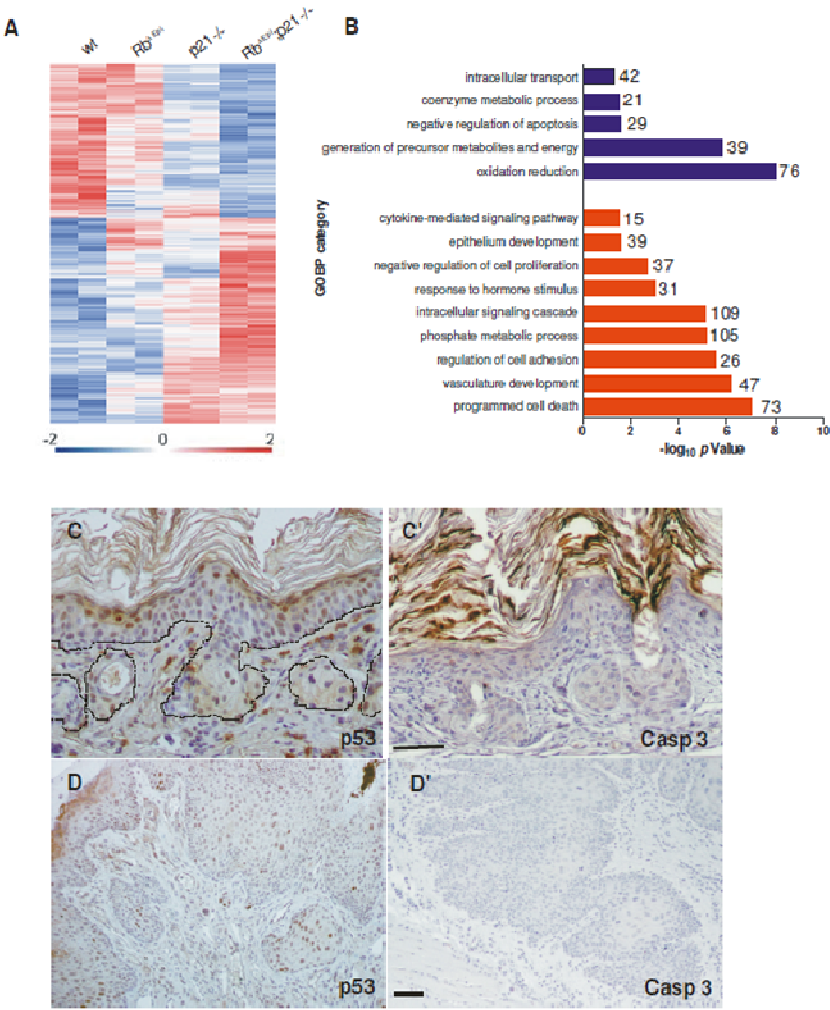
Flow Cytometry analysis

Control and pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice were sacrificed and peripheral blood samples were taken in 0.5M EDTA. Red blood cells were depleted from blood samples using 155 mmol/L NH₄Cl, 10 mmol/L KHCO₃ and 0.5 mM EDTA lysis buffer. Single cell suspensions of submaxillar LNs were prepared by dissociating cells through a 100 μm nylon cell strainer (BD Bioscience). Cell suspensions were stained with anti-mouse Gr-1 FITC (clone RB6-8C5, BD Pharmingen), anti-mouse CD11b-PE or FITC (clone M1/70, BD Pharmingen) and anti-mouse CD49d (clone 9C10-MFR4.B, BD Pharmingen). Cytometric analysis was performed using a Becton Dickinson LSR Fortessa cell analyzer using BD FACSDiva software. Data analysis was performed using FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR).



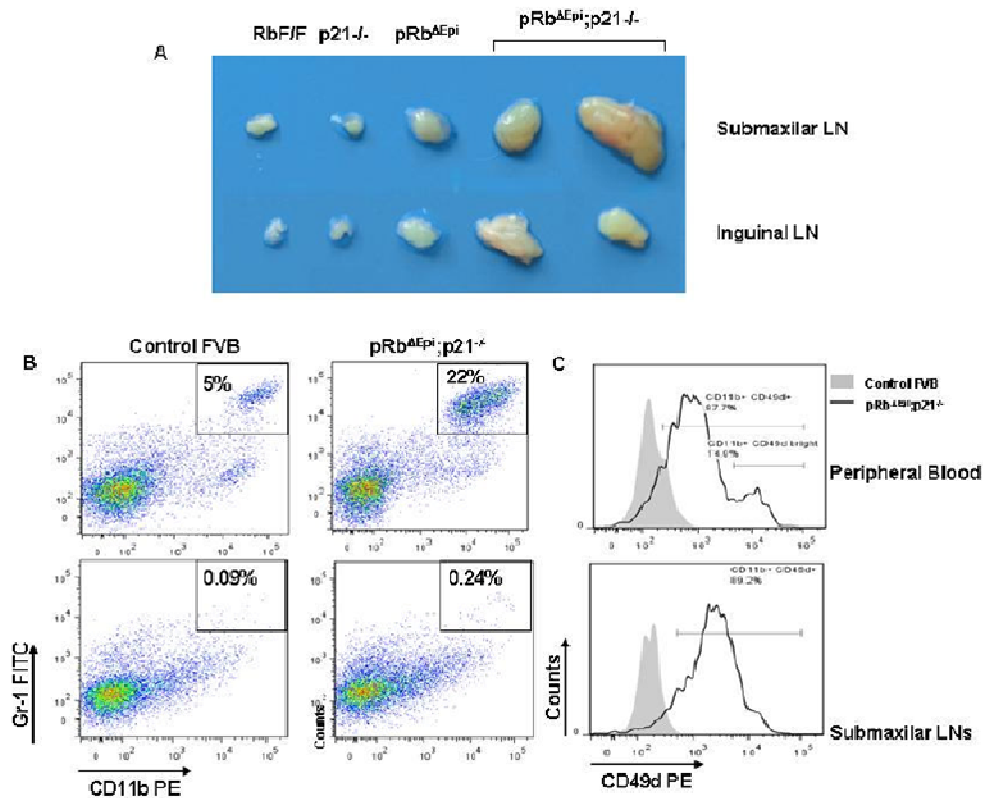
Supplementary Figure S1.

A-C) Skin sections from $pRb^{\Delta Epi};p21^{-/-}$ showing abscess formation (A), epidermal swelling and fragility (B) and wounds (C). D) Kaplan Meyer curve showing overall survival of the quoted genotype. p value was obtained by log rank test. E) Representative immunohistochemistry showing the presence of CD45 positive cells. Bars=100 μ m.



Supplementary Figure S2.

A) Heatmap showing the expression of differentially expressed genes between RbF/F, Rb^{ΔEpi};p21^{-/-}, and pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} skin samples. The corresponding selected probes (Supp Table S1 and S2) were obtained upon microarray analysis and selection as described in Material and Methods. B) Gene Ontology themes with significant enrichment observed in the pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} skin samples (red denotes overexpressed and blue underexpressed genes). Immunohistochemistry detection of p53 in skin (C) or tumoral lesions (D) of pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} and active caspase 3 in skin (C') or tumoral lesions (D'). Bars=50μm.



Supplementary Figure S3.

A) Appearance of the submaxilar and inguinal lymph nodes of the quoted genotypes B), Peripheral blood (PB) and submaxillar lymph node cells (LNs) were evaluated for MDSCs using antibodies targeting Gr-1 and CD11b. C) MDSCs from pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice express high levels of CD49d, a marker known to define a MDSCs population with the strongest inhibitory function of tumor antigen-specific T cell responses.

Supplementary Table S3. Overlap between overexpressed genes in new born pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} skin and in Head and Neck human cancer. The table shows the number of significant overlapping genes among genes overexpressed in Rb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice skin and in human HNSCC comparing tumor *versus* normal tissue.

Data Set	Property: Cancer vs normal tissue	Overlap	P-Value	Odds Ratio
Pveon Multi-cancer	Tongue Carcinoma vs. Normal	155	9.03E-15	2.1
Giordano Thyroid	Tall Cell Variant Thyroid Gland Papillary Carcinoma vs. Normal	133	1.48E-11	2.1
Giordano Thyroid	Thyroid Gland Papillary Carcinoma vs. Normal	133	1.48E-11	2.1
Ginos Head-Neck	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma vs. Normal	125	3.70E-09	1.9
Giordano Thyroid	Follicular Variant Thyroid Gland Papillary Carcinoma vs. Normal	121	4.58E-08	1.8
Pyeon Multi-cancer	Oropharyngeal Carcinoma vs. Normal	131	8.74E-08	1.7
Giordano Thyroid	Thyroid Gland Undifferentiated (Anaplastic) Carcinoma vs. Normal	116	8.40E-07	1.7
Pyeon Multi-cancer	Floor of the Mouth Carcinoma vs. Normal	124	3.56E-06	1.6
Estilo Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma vs. Normal	92	1.25E-05	1.7
Pyeon Multi-cancer	Oral Cavity Carcinoma vs. Normal	121	1.51E-05	1.6
Talbot Lung	Tongue Squamous Cell Carcinoma vs. Normal	91	2.16E-05	1.7
He Thyroid	Thyroid Gland Papillary Carcinoma vs. Normal	119	3.76E-05	1.5
FriersonHF Salivary-gland	Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma vs. Normal	89	5.73E-05	1.6
Ye Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma vs. Normal	117	9.03E-05	1.5
Sengupta Head-Neck	Nasopharyngeal Carcinoma vs. Normal	113	4.61E-04	1.4
Schlingemann Head-Neck	Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma vs. Normal	102	6.85E-04	1.5
Giordano Thyroid	Thyroid Gland Follicular Adenoma vs. Normal	16	0.003	2.3

Data Set: Oncomine
Cancer type: Head and Neck
Data type: mRNA

Supplementary table 4. Overlap between overexpressed genes in new born pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} skin and downregulated genes in human HNSCC. The table shows the number of significant overlapping genes among genes overexpressed in Rb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice skin and downregulated in human HNSCC according to increased stage (Set 1); grade (Set 2); poor clinical outcome (Set 3) or metastatic samples compared to primary tumors (Set 4)

Set 1				
Data set	Property: Stage tipe analysis	Overlap	P-Value	Odds Ratio
Rickman Head-Neck	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma - Advanced Stage	164	6.07E-18	2.3
Bittner Thyroid	Thyroid Gland Papillary Carcinoma - Advanced N Stage	140	3.87E-10	1.9
Sengupta Head-Neck	Nasopharyngeal Carcinoma - Advanced N Stage	135	8.56E-09	1.8
Ye Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma - Advanced N Stage	129	2.64E-07	1.7
O'Donnell Oral	Tongue Squamous Cell Carcinoma - Advanced N Stage	115	1.46E-06	1.7
Bittner Thyroid	Thyroid Gland Papillary Carcinoma - Advanced Stage	116	1.38E-04	1.5
Rickman Head-Neck	Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma - Advanced Stage	114	3.12E-04	1.5
Siebos Head-Neck	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma - Advanced Stage	107	0.004	1.3
Siebos Head-Neck	Laryngeal Squamous Cell Carcinoma - Advanced Stage	59	0.004	1.5
Toruner Head-Neck	Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Epithelia - Advanced N Stage	73	0.006	1.4

Set 2				
Data set	Property: Grade tipe analisis	Overlap	P-Value	Odds Ratio
Rickman Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma - High Grade	184	5.37E-26	2.7
Rickman Head-Neck	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma - High Grade	151	1.87E-13	2.1
Rickman Head-Neck	Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma - High Grade	130	1.53E-07	1.7
Ginos Head-Neck	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma - High Grade	117	4.79E-07	1.7
Siebos Head-Neck	Laryngeal Squamous Cell Carcinoma - High Grade	68	4.61E-05	1.7
Siebos Head-Neck	Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma - High Grade	118	5.86E-05	1.5
Rickman Head-Neck	Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma - High Grade	114	3.12E-04	1.5

Set 3				
Data set	Property: Clinical outcome analysis	Overlap	P-Value	Odds Ratio
Rickman Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma - Dead at 5 Years	155	9.03E-15	2.1
Rickman Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 5 Years	148	1.66E-12	2
Rickman Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma - Dead at 3 Years	133	2.79E-08	1.8
Rickman Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 3 Years	126	1.29E-06	1.6
Rickman Head-Neck	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 5 Years	123	5.81E-06	1.6
Rickman Head-Neck	Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 3 Years	122	9.41E-06	1.6
Cromer Head-Neck	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma - Recurrence at 5 Years	49	3.77E-04	1.8
Rickman Head-Neck	Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma - Dead at 3 Years	113	4.61E-04	1.4
Rickman Head-Neck	Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 1 Year	113	4.61E-04	1.4
Rickman Head-Neck	Tongue Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 1 Year	62	0.001	1.6
Cromer Head-Neck	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 5 Years	47	0.001	1.7
Rickman Head-Neck	Hypopharyngeal Squamous Cell Carcinoma - Dead at 1 Year	109	0.002	1.4
Cromer Head-Neck	Head and Neck Squamous Cell Carcinoma - Metastatic Event at 3 Years	13	0.006	2.4

Set 4				
Data set	Property: Metastasis vs primary analysis	Overlap	P-Value	Odds Ratio
Jain Endocrine	Head and Neck Cancer - Metastasis	15	7.81E-04	2.9
O'Donnell Oral	Head and Neck Cancer - Metastasis	100	0.001	1.4

Data set: Oncomine

Cancer type: Head and Neck

Data type: mRNA

Supplementary table 5. Overlap between overexpressed genes in new born pRb^{ΔEpi};p21^{-/-} skin and overexpressed or underexpressed genes in Head and Neck cell lines according to their response to specific chemotherapeutics drugs. The table shows the number of significant overlapping genes among genes overexpressed in Rb^{ΔEpi};p21^{-/-} mice skin and overexpressed (Set 1) or underexpressed (Set 2) genes of different HNSCC cell lines upon treatment with the indicated chemotherapeutics drugs. A similar trend indicates sensitiveness (Set 1), whereas opposite trend indicates resistance (Set 2).

Set 1				
Data set	Property: Drug sensityve analysis	Overlap	P-Value	Odds Ratio
Wooster CellLine	MEK inhibitor GSK1120212 Sensitive - Multi-cancer Cell Line	169	7.90E-20	2.4
Wooster CellLine	Paclitaxel Sensitive - Multi-cancer Cell Line	123	5.81E-06	1.6
Wooster CellLine	PI3K inhibitor BEZ235 Sensitive - Multi-cancer Cell Line	111	9.82E-04	1.4

Set 2				
Data set	Property: Drug sensityve analysis	Overlap	P-Value	Odds Ratio
Wooster CellLine	Pazopanib Sensitive - Multi-cancer Cell Line	146	6.81E-12	2
Wooster CellLine	Temsirolimus Sensitive - Multi-cancer Cell Line	135	8.56E-09	1.8
Wooster CellLine	AURKB inhibitor GSK1070916 Sensitive - Multi-cancer Cell Line	130	1.53E-07	1.7
Wooster CellLine	PLK inhibitor GSK661637 Sensitive - Multi-cancer Cell Line	119	3.76E-05	1.5

Data Set : Oncomine

Cancer type: Head and Neck

Data tipe: mRNA

